

BUDAPESTI CORVINUS EGYETEM

DOKTORI ÉRTEKEZÉS

**PROTEOMIKAI MÓDSZEREK ALKALMAZÁSA
KÜLÖNBÖZŐ EREDETŰ FEHÉRJÉK
VIZSGÁLATÁRA**

HORVÁTHNÉ SZANICS ENIKŐ

**Központi Élelmiszer-tudományi Kutatóintézet
Táplálkozástudományi Osztály**

Budapest

2007

A doktori iskola

megnevezése: Élelmiszertudományi Doktori Iskola.

tudományága: Élelmiszertudományok

vezetője: Dr. Fodor Péter
egyetemi tanár, DSc
Budapesti Corvinus Egyetem,
Élelmiszertudományi Kar,
Alkalmazott Kémia Tanszék

Témavezető: Dr. Hajós Gyöngyi [†]
osztályvezető, DSc
Központi Élelmiszer-tudományi Kutatóintézet
Táplálkozástudományi Osztály

A jelölt a Budapesti Corvinus Egyetem Doktori Szabályzatában előírt valamennyi feltételnek eleget tett, az értekezés műhelyvitájában elhangzott észrevételeket és javaslatokat az értekezés átdolgozásakor figyelembe vette, azért az értekezés nyilvános vitára bocsátható.

.....
Az iskolavezető jóváhagyása

.....
A témavezető jóváhagyása

A Budapesti Corvinus Egyetem Élettudományi Területi Doktori Tanács 2007. június 12-i határozatában a nyilvános vita lefolytatására az alábbi Bíráló Bizottságot jelölte ki:

BÍRÁLÓ BIZOTTSÁG:

Elnöke

Farkas József, MHAS, Budapesti Corvinus Egyetem

Tagjai

Lukács Noémi, CSc, Budapesti Corvinus Egyetem

Maráz Anna, CSc, Budapesti Corvinus Egyetem

Tamás László, PhD, Eötvös Lóránd Tudományegyetem

Dernovics Mihály, PhD, Budapesti Corvinus Egyetem

Opponensek

Szarka András, PhD, Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem

Tömösközi Sándor, PhD, Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem

Titkár

Dernovics Mihály, PhD, Budapesti Corvinus Egyetem

TARTALOMJEGYZÉK

TARTALOMJEGYZÉK	4
Rövidítések jegyzéke	7
I. BEVEZETÉS	9
II. IRODALMI ÁTTEKINTÉS.....	11
II. 1. Gabonafehérjék vizsgálata elektroforetikus technikákkal.....	11
II. 1. 1. Poliakrilamid gélelektroforézis alkalmazása gabonafehérjék vizsgálatában	12
II. 1. 2. Nagyfelbontású kapilláris elektroforézis (HPCE) alkalmazási területei.....	13
II. 1. 2. 1. Szabad zónás kapilláris elektroforézis	13
II. 1. 2. 2. Nátrium-dodecil-szulfát kapilláris elektroforézis (SDS-CE)	14
II. 1. 2. 3. Kétdimenziós HPLC-HPCE	14
II. 2. Proteomika.....	15
II. 2. 1. Genomikától a proteomikáig	15
II. 2. 2. A proteomika kialakulása	16
II. 2. 3. A proteomikai módszerek csoportosítása	17
II. 2. 4. A proteomika gyakorlata	17
II. 2. 4. 1. Kétdimenziós gélelektroforézis (2-DE).....	18
II. 2. 4. 2. Kétdimenziós gélelektroforézis (2-DE) alternatívái.....	20
II. 2. 4. 3. Fehérje-detektálási módszerek	21
II. 2. 4. 4. Fehérjék azonosítása tömegspektrometriás technikával.....	22
II. 3. Élelmiszerfehérjék vizsgálata proteomikával.....	25
II. 3. 1. Allergén élelmiszerfehérjék	25
II. 3. 2. Stressz-fehérjék és allergia	28
II. 3. 3. Génmódosítás	28
II. 4. Gabonafehérjék vizsgálata proteomikával	29
III. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	32
III. 1. Anyagok	32
III. 1. 1. A vizsgált minták	32
III. 1. 2. Vegyszerek.....	32
III. 2. Módszerek.....	33
III. 2. 1. Hereward búza fehérjéinek proteomikai vizsgálata	33
III. 2. 1. 1. Búzafehérjék oldhatóság szerinti frakcionálása.....	33
III. 2. 1. 2. Búzafehérjék hidrofób tulajdonság szerinti szeparálása	33
III. 2. 1. 3. Búzafehérjék szeparálása egydimenziós gélelektroforézissel.....	34

III. 2. 1. 4. Búzafehérjék szeparálása kétdimenziós gélelektroforézissel	35
III. 2. 1. 5. Fehérjeazonosítás MALDI-MS alkalmazásával	36
III. 2. 2. Szülői és transzgénikus búza vonalak fehérjéinek proteomikai vizsgálata.....	36
III. 2. 2. 1. Növényi anyag, szövetkultúra és transzformáció	36
III. 2. 2. 2. Búzafehérjék oldhatóság szerinti frakcionálása.....	37
III. 2. 2. 3. Kétdimenziós gélelektroforézis.....	38
III. 2. 2. 4. Fehérjeazonosítás MALDI-MS alkalmazásával	38
III. 2. 2. 5. Elektroforetikus blot technika és immunreakció	39
III. 2. 3. Marko tritikále proteomikai vizsgálata	40
III. 2. 3. 1. Tritikálefehérjék oldhatóság szerinti frakcionálása	40
III. 2. 3. 2. Tritikálefehérjék szeparálása egydimenziós gélelektroforézissel.....	40
III. 2. 3. 3. Tritikálefehérjék biológiai aktivitásának vizsgálata	42
III. 2. 3. 4. Tritikálefehérjék szeparálása kétdimenziós gélelektroforézissel.....	42
III. 2. 3. 5. Fehérjeazonosítás MALDI-MS alkalmazásával	42
III. 2. 4. Árpa vonalak elektroforetikus vizsgálata.....	42
III. 2. 4. 1. Árpafehérjék extrakciója.....	43
III. 2. 4. 2. Árpafehérjék szeparálása kétdimenziós gélelektroforézissel.....	43
III. 2. 5. Baktériumfehérjék proteomikai vizsgálata	43
III. 2. 5. 1. Baktériumfehérjék izolálása.....	43
III. 2. 5. 2. Oldható fehérjetartalom mérése	43
III. 2. 5. 3. Kétdimenziós gélelektroforézis.....	44
III. 2. 5. 4. Fehérjeazonosítás LC-MS/MS alkalmazásával	45
IV. CÉLKITŰZÉSEK.....	46
V. EREDMÉNYEK ÉS KÖVETKEZTETÉSEK.....	47
V. 1. Hereward búza kétdimenziós fehérje-térképének elkészítése és a fehérjék azonosítása	47
V. 1. 1. Kétdimenziós elektroforézis és MALDI-MS technika alkalmazása só- és vízdoldható búzafehérjék elválasztására és azonosítására.....	47
V. 1. 2. Kétdimenziós elektroforézis és MALDI-MS technika alkalmazása alkohol-oldható búzafehérjék fehérje-térképének elkészítésére.....	56
V. 1. 3. Kétdimenziós elektroforézis és MALDI-MS technika alkalmazása a sav-oldható búzafehérjék fehérje-térképének elkészítésére.....	58
V. 2. Búzafehérjék allergén jellege és hidrofób tulajdonsága közötti összefüggés feltérképezése.....	60
V. 2. 1. Albumin-globulin búzafehérjék elválasztása hidrofób tulajdonság alapján	60
V. 2. 2. Kétdimenziós elektroforézis és MALDI-MS technika alkalmazása különböző hidrofób tulajdonságú albumin-globulin búzafehérjék azonosítására	63

V. 3. Környezeti változás hatásainak nyomon követése szülői és transzgénikus búza vonalak fehérje-összetételében kétdimenziós elektroforézis és MALDI-MS technika alkalmazásával	67
V. 3. 1. Szárazság-stressz hatásának vizsgálata szülői és transzgénikus búza vonalak albumin-globulin fehérjéinek mintázataira.....	67
V. 3. 2. Szárazság-stressz hatásának vizsgálata szülői és transzgénikus búza vonalak albumin-globulin fehérjéinek biológiai aktivitására.....	70
V. 3. 3. Szárazság-stressz hatásának vizsgálata szülői és transzgénikus búza vonalak gliadin-glutenin fehérjéinek mintázataira.....	71
V. 4. Marko tritikále fehérje-összetételének és biológiai aktivitásának vizsgálata az érés függvényében	72
V. 4. 1. Marko tritikále albumin-globulin fehérjék immun-reaktív jellegének változása az érés során	72
V. 4. 2. Marko tritikále albumin-globulin frakcióinak összehasonlító vizsgálata az érési állapot függvényében	74
V. 5. Szárazság-stressz hatásának vizsgálata különböző tavaszi árpa vonalak fehérje-mintázataira	78
V. 6. Kétdimenziós elektroforézis és LC-MS/MS technika alkalmazása hőstressz hatására képződött bakteriális fehérjék kimutatására és szekvenálására	81
VI. ÖSSZEFOGLALÁS	86
VII. TÉZISEK.....	90
M. 1. Irodalomjegyzék	91
M. 2. További mellékletek	104
KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	108

Rövidítések jegyzéke

2-DE	kétdimenziós gélelektroforézis
A-PAGE	savas poliakrilamid gélelektroforézis
APS	ammónium-perszulfát
BSA	marha szérum albumin
CE-MS	kapilláris elektroforézis-tömegspektrometria
CHAPS	3- [3-kolamidopropil)-dimetilammónium]-1-propánszulfonát
DNS	dezoxiribonukleinsav
DPA	virágzás utáni napok (day after post-anthesis)
DTT	DL- treo- 1,4- dimerkapto-2,3- butándiol
ESI-MS	elektrospray tömegspektrométer
EST	Expressed Sequence Tag (részleges aminosav-sorrend meghatározáson alapuló azonosítás)
FZCE	szabad zónás kapilláris elektroforézis
G250	Coomassie Brilliant Blue G 250 festék
HIC	hidrofób kölcsönhatási kromatográfia
HMW-GS	nagy molekulatömegű glutenin alegység
HPCE	nagyfelbontású kapilláris elektroforézis
HPLC	nagyfelbontású folyadék kromatográfia
IEF	izoelektromos fókuszálás
IgE	immunglobulin E
IPG	immobilizált pH gradiens
LC-MS	folyadék kromatográfia – tömegspektrometria
LC-MS/MS	folyadék kromatográfia – tandem tömegspektrometria
LMW-GS	kis molekulatömegű glutenin alegység
MALDI-TOF-MS	mátrixhoz kötött lézer ionizációs – „repülési idő” tömegspektrométer
MS	tömegspektrometria
MS/MS	tandem tömegspektrometria
MudPIT	multidimenzionális fehérje azonosítási technika (Multi dimensional Protein Identification Technology)
PAGE	poliakrilamid gélelektroforézis
pI	izoelektromos pont

PMF MOWSE	Peptide Mass Fingerprint alapján Molecular Weight Search program segítségével végzett azonosítás
PR-fehérjék	patogenezissel összefüggésbe hozható fehérjék
R250	Coomassie Brilliant Blue R 250 festék
RNS	ribonukleinsav
SDS	nátrium-dodecil-szulfát
SDS-CE	nátrium-dodecil-szulfát kapilláris elektroforézis
SDS-PAGE	nátrium-dodecil-szulfát poliakrilamid gélelektroforézis
TCA	triklór-ecetsav
TEMED	N, N,N',N'- tetrametil- etilén-diamin
TRISZ	trisz- (hidroximetil)-amino- metán

I. BEVEZETÉS

Az EU a jelen és a jövő alapvető feladatának tekinti a nagy mennyiségű és jó minőségű fehérjét tartalmazó növényi magok (így a gabonafélék) élelmiszerbiztonsági szempontból megfelelő kínálatát. Egy élelmiszeripari termék minőségének része a biztonságos fogyaszthatóság is, amelynek monitorozása a fogyasztók védelme és a piaci eladhatóság, de környezeti terhelés problémái miatt is egyre jelentősebb teret kap. Az élelmiszeripari alapanyagok összetevőiben, azaz a növények fehérje-összetételében a különböző biotikus, abiotikus környezeti hatások, illetve a génmódosítás is változásokat eredményezhet.

Az élelmiszerbiztonság, az egészségmegőrző táplálkozás szempontjából a környezeti változások eredményeként szintetizálódott új fehérjék vizsgálata szükséges, annak megítélésére, hogy ezen fehérjék a növényi allergén családokhoz tartoznak-e, PR (*pathogenesis-related*) fehérjék-e, rendelkeznek-e nutritív vagy antinutritív biológiai aktivitással. A génmódosított termékek esetében elvárás, hogy az új termékek legalább olyan biztonságosak legyenek, mint a hagyományosak. A génmódosítással előállított növényekben az allergén fehérjék megjelenése komoly kockázati tényező lehet. Ezért alapvetően fontos volna az ismert allergén fehérjék szerkezetének tanulmányozása is. A fogyasztók és a szakmai közvélemény egyaránt igényli az objektív élelmiszer biztonsági/minőségi kísérleteket.

A molekuláris biológia központi tétele a genetikai információ áramlását az élő szervezetekben a DNS-től az RNS-en keresztül a fehérjékig határozza meg. A legújabb technikák már alkalmasak arra, hogy ezen biomolekulák közötti sokféle kölcsönhatásról és a genetikai információ-áramlás minden egyes lépcsőfokáról, az azokat befolyásoló specifikus körülményekről, így a környezeti hatásokról és a stressz állapotokról információt nyerjünk. Ezen technikák között megemlíthetjük a genomikát, a transzkriptomikát, a proteomikát, valamint a glikomikát (Hirabayashi és Kasai, 2002) és a metabolomikát (Sumner, 2003) is. Kutatásaim során ezen újszerű megközelítést jelentő vizsgálatok közül a proteomikát alkalmaztam.

A proteom tanulmányozásával lehetőség nyílik arra, hogy az élelmiszer-tudomány szempontjából jobban megérthessük az élelmiszerminőséget befolyásoló tényezőket, azokat az utakat, amelyeken a gének adott környezeti körülmények között expresszálódnak. A proteomika számos bonyolult módszert kombinál a fehérjék azonosítására és mennyiségi meghatározására. A proteom összetételét láthatóvá tévő legfőbb módszer a kétdimenziós gélelektroforézis (2-DE). Az elválasztott fehérjék azonosítására, szekvenciájuk meghatározására ma a nagy érzékenységű elektropray (ESI) és mátrixhoz kötött lézer ionizációs – „repülési idő” (MALDI-TOF) tömegspektrométereket alkalmazzák.

Munkám során az eddig napjainkban leginkább az orvostudományi és a gyógyszerészeti kutatásokban elterjedt proteomikai vizsgálatokat alkalmaztam az élelmiszertudomány területén. Kísérleteimben az allergén búzafehérjék allergenitása és hidrofób jellege közötti összefüggést vizsgáltam. A környezeti változás hatását követtem nyomon szülői és transzgénikus búza vonalak, illetve tavaszi árpa vonalak fehérje-összetételében. Tanulmányoztam egy tritikále vonal fehérje-összetételének és biológiai aktivitásának változását az érési állapot függvényében.

II. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

II. 1. Gabonafehérjék vizsgálata elektroforetikus technikákkal

Az endosperm fehérjék extrakciójának még ma is a legszélesebb körben alkalmazott módja az oldószeres kinyerés és az ezt követő csapadékképzésen alapuló frakcionálás. Osborne (1907) javaslata alapján a gabonafehérjéket oldhatóságuk alapján négy csoportba sorolhatjuk: víz-oldható albuminok, só-oldható globulinok, alkohol-oldható gliadinok és híg savakban, illetve lúgokban oldódó gluteninek. Vannak azonban olyan proteinek, amelyek egyik csoportba sem sorolhatók, ezek az Osborne-szerinti frakcionálás végén visszamaradó oldhatatlan fehérjék. Az Osborne-eljárás alkalmazásakor általános megfigyelés a különböző frakciók fehérjéinek átoldódása. Az 1. táblázat az egyes búzaszem frakciók fehérje-összetételét mutatja.

Frakciók	Simmonds (1978)	Lásztity (1999)	Belitz és Grosch (1987)	Konarev (1980)
Albumin	5-10	6,63-12,10	14,7	7-10
Globulin	5-10	4,25-7,15	7,0	4-6
Gliadin	40-50	30,62-56,30	32,6	40-45
Glutenin és a maradék	30-40	28,88-56,34	45,3	40-55

1. táblázat

A búzaszem frakciók szerinti fehérje-összetétele (%) (Lásztity, 1999)

Az oldószeres kivonással és lépcsőzetes kicsapással frakcionált gabonafehérjék további elválasztása számos analitikai módszerrel valósítható meg, ezek közül az egyik leggyakrabban használt technika az elektroforézis. Az élelmiszeranalitika területén az elektroforetikus módszerek jelentős szerepet kaptak a növényi, állati fehérjék és peptidek vizsgálatában, izolálásában, jellemzésében, valamint tisztításában (Hajós, 1993, Marri és mtsai., 2003, Ovando és mtsai., 2004, Mayer, 2005). Az elektroforézis alkalmas az idegen fehérjék kimutatására, élelmiszerek fehérje-összetételének meghatározására, a fehérjeszerkezetet befolyásoló tényezők hatásának vizsgálatára.

II. 1. 1. Poliakrilamid gélelektroforézis alkalmazása gabonafehérjék vizsgálatában

Az egyedülálló sikérképző tulajdonságuk miatt az endosperm tartalék fehérjék vizsgálata került előtérbe, szemben az endosperm egyéb, metabolizmus szempontjából aktív (albumin és globulin) fehérjéinek tanulmányozásával. A kezdetben alkalmazott keményítőgél elektroforézises technikát (Woychik és mtsai., 1961), illetve a mozgó határfelületek módszerét (Jones és mtsai., 1959) fokozatosan felváltotta a poliakrilamid gélek felhasználása (Lásztity, 1981).

A gabonafehérjék tanulmányozására a poliakrilamid gélben végzett elválasztásnak két formája terjedt el, a nátrium-dodecil-szulfát poliakrilamid gélelektroforézis (SDS-PAGE) és a savas poliakrilamid gélelektroforézis (A-PAGE). Az SDS-PAGE elválasztásnál a detergens (SDS) elfedi a fehérje saját töltését, megszünteti az alegységek közötti kölcsönhatásokat, ha azokat nem diszulfidkötések stabilizálják. β -merkaptó-etanol hozzáadásával ezek a diszulfidkötések felbonthatók. Ilyen körülmények között a fehérje mozgékonyágát elektromos térben csak a mérete befolyásolja. A detergens nélküli, savas pH-n végzett elválasztás (A-PAGE) alapja viszont a fehérjék eltérő töltéssűrűsége.

A gliadin komponenseket Jones és mtsai. (1959) eltérő elektroforetikus mozgékonyáguk alapján: α -, β -, γ - és ω -gliadinoknak nevezték el. A kisebb felbontóképességű elektroforézissel elválasztott alfrakciók további szeparálását elsőként Lookhart és Albers (1988) végezték el. Munkájuk során poliakrilamid gélben a tejsav (A-PAGE), illetve az SDS jelenlétében végzett elválasztásokkal kapott fehérje-mintázatokat hasonlították össze. A csak molekulatömeg alapján végzett szeparáláskor az α -, β -, γ -gliadinoknak megfelelő fehérjesávoknál átfedést tapasztaltak. Ezzel szemben a fehérjék eltérő töltéssűrűsége szerint végzett elválasztás esetében határozottan elkülöníthetők voltak az eltérő elektroforetikus mozgékonyággal rendelkező gliadin alfrakciók. A gliadin frakciókhoz tartozó fehérjék egyértelmű genetikai meghatározottsága lehetőséget nyújt a gélelektroforézises technika felhasználásához a fajtaazonosításban. Mivel az α -, β -, γ -gliadinok közel azonos molekulatömeggel ugyanakkor eltérő töltéssel rendelkeznek, ezért a fajtaazonosításban a leggyakrabban alkalmazott elválasztástechnika az A-PAGE.

Payne és mtsai. (1979) különböző búzafajták tartalék fehérjéit tanulmányozták SDS-PAGE elválasztással. Eredményeik szerint a nagy molekulatömegű glutenin komponensek és a sütőipari minőség közötti összefüggés mutatható ki.

A mozgó határfelületek módszere és a kötött (zóna) elektroforézis (SDS-PAGE, A-PAGE) mellett az elektroforetikus technikák harmadik csoportjába tartozó izoelektromos fókuszálás (IEF) is elterjedt módja a gabonafehérjék tanulmányozásának. A vizsgálati módszer hátránya azonban, hogy az eltérő oldékonysággal jellemezhető fehérjék oldatba vitele nehezen kivitelezhető, ezért

növényi eredetű fehérjék, illetve élelmiszerfehérjék izoelektromos pont szerinti elválasztásához igen elterjedt a karbamid használata (Righetti és Bosisio, 1981).

II. 1. 2. Nagyfelbontású kapilláris elektroforézis (HPCE) alkalmazási területei

A kapilláris méretben végzett, elektromigráción alapuló elválasztás egyike a leggyorsabban fejlődő elválasztási módszereknek. A kapilláris elektroforetikus módszerek gyorsaságuknak, automatizálhatóságuknak, jó felbontásuknak (10^6 elméleti tányérszám/ m) és a kis anyagigényüknek köszönhetően nagyon gyorsan elterjedtek (Idei és Hajós, 2001). Gabonafehérjék tanulmányozását a „klasszikus” elektroforézis mellett gyakran végzik HPCE alkalmazásával.

II. 1. 2. 1. Szabad zónás kapilláris elektroforézis

A nagyfelbontású kapilláris elektroforézis technikák közül a gabonafehérje vizsgálatokban elsősorban a szabad zónás kapilláris elektroforézist alkalmazzák (FZCE). Az elválasztási módszer alapja, hogy a minta fehérjekomponensei a töltés/tömeg arány különbségéből adódó, látszólagos mozgékonyaságukban mutatkozó eltérés alapján szeparálhatók.

Az FZCE legfontosabb alkalmazási területe - a két poliakrilamid gélelektroforézis technikához (A-PAGE és SDS-PAGE) hasonlóan - a gabonák fajtaazonosítása. A vizsgálati módszer sikeres alkalmazását elsőként Werner és mtsai (1994) publikálták. Kutatásaikban az alkohol-oldható fehérjék FZCE analízise alapján egyértelműen elkülöníthető volt a vizsgált 12 búzafajta. Ugyanezen komponensek nagyobb felbontású elválasztását valósította meg Bietz és Schmalzried (1995) savas pH-jú (2,5) foszfát puffer alkalmazásával. Későbbi irodalmi adatok szerint már igen rövid idejű (10 perc) kapilláris elektroforézissel sikeres fajtaazonosítási vizsgálatok végezhetők el (Lookhart és Bean, 1995). A gyors szeparálással ugyan csökken az elválasztás felbontása, azonban az alkalmazott foszfát puffer jelenlétében genetikailag igen közel eső búzafajták is azonosíthatók.

Fontos szerepet kapott az FZCE a gabonafehérjék jellemzésében és osztályozásában is. Az Osborne nyomán oldhatóság alapján meghatározott fehérjefrakciókat Lookhart és Bean (1995) foszfát puffer jelenlétében szeparálták és jellemezték. Eredményeik szerint az albumin és a globulin fehérjéket tartalmazó csúcsokat az első 4 percben detektálták, majd a közel azonos mozgékonyasággal rendelkező tartalék fehérjék jelentek meg az elektroforetogramon.

Meghatározó az FZCE technika jelentősége a fajtakiválasztásban, a sütőipari minőséget meghatározó összefüggések (Weegels és mtsai., 1995) tanulmányozásában is. Shomer és mtsai.

(1995, 1998) az FZCE technikát elektron mikroszkópos vizsgálatokkal kiegészítve tanulmányozták az albumin, illetve a globulin fehérjék lehetséges szerepét a sütőipari tulajdonságok kialakításában, majd vizsgálataikat a gliadin és a glutenin fehérjékre is kiterjesztették. A hő hatására koagulált polipeptidek elektroforetikus mintázata és a sütőipari minőség között összefüggést állapítottak meg különböző sütőipari tulajdonságokkal rendelkező búzafajták tanulmányozásával.

II. 1. 2. 2. Nátrium-dodecil-szulfát kapilláris elektroforézis (SDS-CE)

A nagyfelbontású kapilláris elektroforézis technikák közül a FZCE mellett elterjedt még a kapillárisban végzett molekulatömeg szerinti elválasztás is (Bean és Lookhart, 2001). Búzafehérjék vizsgálatára Werner és mtsai. (1994) publikálták elsőként a nátrium-dodecil-szulfát kapilláris elektroforézis (SDS-CE) alkalmazását. A kapillárisban végzett gélelektroforézishez lineáris (nem térhálós) poliakrilamid gélt használtak. A térhálós poliakrilamidgél ugyanis a kapilláris elektroforézis körülményei között nem mutat kellő stabilitást, csak néhány minta analízisére alkalmas és nem tölthető újra. Négy különböző polimer (dextrán, polietilén-oxid, lineáris poliakrilamid és egy a Bio-Rad cég által forgalmazott polimer) SDS-CE céljából történő alkalmazhatóságát tanulmányozta Bean és Lookhart (1999). A kereskedelmi forgalomban kapható Bio-Rad polimerrel végzett szeparálás nagy felbontóképességgel, viszont hosszú (40 perc) elválasztási idővel jellemezhető. Hasonló eredményeket kaptak a dextrán alkalmazásakor. A poliakrilamid, illetve a polietilén-oxid használatával az elválasztás során meghatározott molekulatömegek a fehérjék valódi molekulatömegénél nagyobb értéket mutattak, feltételezhetően a vizsgált fehérje és a polimer között kialakuló kölcsönhatás eredményeként.

Parris és mtsai. (1997) kukorica alkohol-oldható fehérjéinek SDS-CE elválasztását és mennyiségi meghatározását végezték el. Megállapították, hogy az alkalmazott módszerrel eredményesen mérhető a zein mennyisége.

II. 1. 2. 3. Kétdimenziós HPLC-HPCE

Az egydimenziós kapilláris elektroforézis technikák mellett már a 90-es évek végén publikáltak kétdimenziós HPLC-HPCE módszereket (Bean és Lookhart, 1997). Különböző őszi búzák gliadin és glutenin fehérjéit első dimenzióban reverz-fázisú HPLC-vel választották el, majd a kapott frakciók további vizsgálatát második dimenzióban FZCE-vel végezték. A kromatográfiás és az elektroforetikus elválasztással kapott adatokból számítógépes szoftverrel, egy a 2-DE fehérje-térképhez hasonló kétdimenziós térkép állítható elő. Szintén reverz-fázisú HPLC és FZCE

alkalmazásával Lookhart és mtsai. (1999) árpaminták fajtaazonosítását végezték el az alkoholdható hordein fehérjék alapján.

A kapilláris elektroforézis alkalmazása a gabonafehérjék, elsősorban a tartalék fehérjék, vizsgálatának területén gyorsan elterjedt. Ehhez nagymértékben hozzájárult a technika nagy felbontóképessége, gyorsasága és automatizálhatósága. Az elválasztás ismételhetőségét (Day és mtsai., 1999, Capelli és mtsai., 1998, Olivieri és mtsai., 1999) számos tanulmány megerősíti.

Az egyéb, nem tartalék fehérjék esetében azonban a CE alkalmazása bonyolult. Bean és Lookhart (1998) megállapította, hogy az albumin és a globulin fehérjék - vagy a búzaliszt egyéb víz- és sóoldható komponensei - hajlamosak a kapilláris falához kötődni, ami az alapvonal elmozdulását és a csúcsok elnyúlását eredményezheti. A probléma kiküszöbölésének egyik lehetséges módja az elválasztást követő hatékony oszlop ekvibrálás, ami azonban jelentős mértékben megnövelheti a szeparálás időigényét.

II. 2. Proteomika

II. 2. 1. Genomikától a proteomikáig

A genomika célja egy élő szervezet teljes genomjának a feltérképezése. Elsőként Sanger és mtsai. (1982) a lambda bakteriofág genetikai állományának nukleotid szekvenciáját határozták meg. A DNS szekvenálási módszerek és a hozzákapcsolódó informatikai háttér gyors fejlődése lehetővé tette az első eukarióta növény, az *Arabidopsis thaliana* teljes genomjának szekvenálását (The Arabidopsis Genome Initiative, 2000). Az ERGO adatbázis (<http://wit.intergratedgenomics.com>) 2006. szeptemberben frissített adatai szerint 1074 élőlény genomját már teljesen vagy részben feltérképezték. Több mint 600 baktérium és 240 vírus mellett 133 eukarióta genetikai állománya szerepel az adatbázisban. A „modell” növény (*Arabidopsis thaliana*) tanulmányozásának következő lépése az expresszáladott fehérjék meghatározása és azonosítása, az így felépülő adatbázis 2010-re válik elérhetővé.

Az elmúlt években a kereskedelmi szempontból meghatározó növények területén folytatódtak a genetikai állományt meghatározó kutatások. A viszonylag kis genommérettel (420 Mb) rendelkező rizs nukleotid szekvenciáját tartalmazó adatbázis már hozzáférhető (<http://rgp.dna.affrc.go.jp/IRGSP/index.html>). A három fő mezőgazdasági gabonanövény közül a búzának van a legnagyobb genommérete (16000 Mb), ami körülbelül nyolcszorosa a kukoricáénak, és negyvenszer nagyobb a rizs genomméreténél.

Egy adott növény genomjának feltérképezése hozzájárulhat az élő szervezet működésének megismeréséhez, ugyanakkor információhoz juthatunk, pl. a gabonák minőséget meghatározó tulajdonságairól is. A genetikai állományban rejlő információ megismerésének első lépése az adott gén által expresszált polipeptidek meghatározása.

A génexpresszió tanulmányozása történhet mRNS vagy fehérje szinten, tekintettel arra, hogy az mRNS mennyisége nincs összefüggésben a megfelelő fehérje mennyiségével, ezért a génexpresszió vizsgálatának pontosabb módja az expresszált fehérje meghatározása. Anderson és Seilhamer (1997) humán máj fehérjéi és mRNS-ei közötti mennyiségi összefüggést tanulmányozta kétdimenziós elektroforézissel és Transcript Image technikával. Vizsgálataik igen kis (0,5) korrelációs koefficienszt mutattak. Gygi és mtsai. (1999) hasonló eredményeket publikáltak *Saccharomyces cerevisiae* vizsgálatokkor. Az mRNS mennyisége alapján egyértelműen nem tudták meghatározni az expresszáldott fehérjék mennyiségét. Ugyanazon gének esetében azonos mRNS mennyiség mellett 20-szoros eltérést detektáltak a fehérjék mennyiségében.

II. 2. 2. A proteomika kialakulása

A proteomika kifejezést először 1995-ben használták egy sejt, szövet vagy szerv összes fehérjéjének kvalitatív és kvantitatív meghatározására (Anderson és Anderson, 1996). A proteom a genom által kifejezett teljes fehérjeállomány (PROTEins expressed by the genOM).

A megfelelő felbontású elválasztástechnika kialakulásának mérföldköve 1975 volt, amikor O'Farrell elsőként alkalmazta a kétdimenziós gélelektroforézist *Escherichia coli* radioaktívan jelzett fehérjéinek tanulmányozásához. A technika nagy felbontóképessége néhány ezer fehérje elválasztását is lehetővé teszi egyetlen egy gélben. Ebben az időben a fehérjék azonosítása azonban a gélen elválasztott kis mennyiség és a megfelelő érzékenységű technika hiányában, nehezen volt megoldható. A proteomika történetében a következő kiemelkedő esemény az Edman szekvenálás érzékenységének növelése volt az elektroforetikusán átblottolt fehérjék azonosítására, mikroszekvenciális technikával (Aebersold és mtsai., 1988). Napjainkban a leggyakrabban használt fehérjeazonosítási technikák az elektropray ionizációs (ESI) és a mátrixhoz kötött lézer ionizációs (MALDI) tömegspektrometria. Kifejlesztésük John Fenn és Koichi Tanaka nevéhez fűződik. Munkájukat 2002-ben kémiai Nobel-díjjal jutalmazták.

II. 2. 3. A proteomikai módszerek csoportosítása

A kezdeti meghatározás után ma már több csoportját különböztetjük meg a proteomikai módszereknek: expressziós proteomika, funkcionális proteomika, fehérje-fehérje kölcsönhatás, strukturális (szerkezeti) proteomika, fehérje poszt-transzlációs módosítások vizsgálata.

Expressziós proteomika: egy adott minta különböző körülmények között expresszáldott fehérjéinek mennyiségi összehasonlítása. Az eljárás során lehetőség nyílik up vagy down regulált fehérjék meghatározására, pl. alacsony hőmérséklet hatásának vizsgálata lenmag fehérjék expressziójára (Tafforeau és mtsai., 2002), szárazság-stressz hatása rizs levelének fehérje-összetételére (Salekdeh és mtsai., 2002).

Funkcionális proteomika: a fehérjék szerepének meghatározása különböző életfolyamatokban és változó környezeti körülmények között.

Strukturális proteomika: célja egy fehérje-komplex vagy egy adott sejtszerv összes fehérjéjének azonosítása és szerkezetének meghatározása, pl. rizs mitokondriális fehérjéinek (Heazlewood és mtsai., 2003), *Arabidopsis thaliana* kloroplaszt proteomjának (Schubert és mtsai., 2002) vizsgálata. Az eredmények alapján információt kapunk az adott sejt felépítéséről és a meghatározott fehérje szerepéről.

A fehérjék poszt-transzlációs módosításainak tanulmányozása a proteomika egyik fontos területe. A fehérjék foszforilációjának (Zhou és mtsai., 2001) kiemelkedő szerepe van a jelátvitelben, a polipeptidek glikolizációjának (Kaji és mtsai., 2003) pedig a fehérjék közötti kölcsönhatásokban, illetve az enzimatis aktivitásban.

A fehérje-fehérje kölcsönhatások vizsgálatának fontos szerepe van például az anyagcsere folyamatok megismerésében. A metabolizmusban részt vevő enzimek specificitásukat nemegyszer fehérje-komplexek formájában érik el, más enzimekkel vagy alegységekkel összekapcsolódva. Ezen fehérje-komplexek összetételének, szerkezetének tanulmányozása az anyagcsere utak mélyebb megértését eredményezhetik (Komatsu és Yano, 2006).

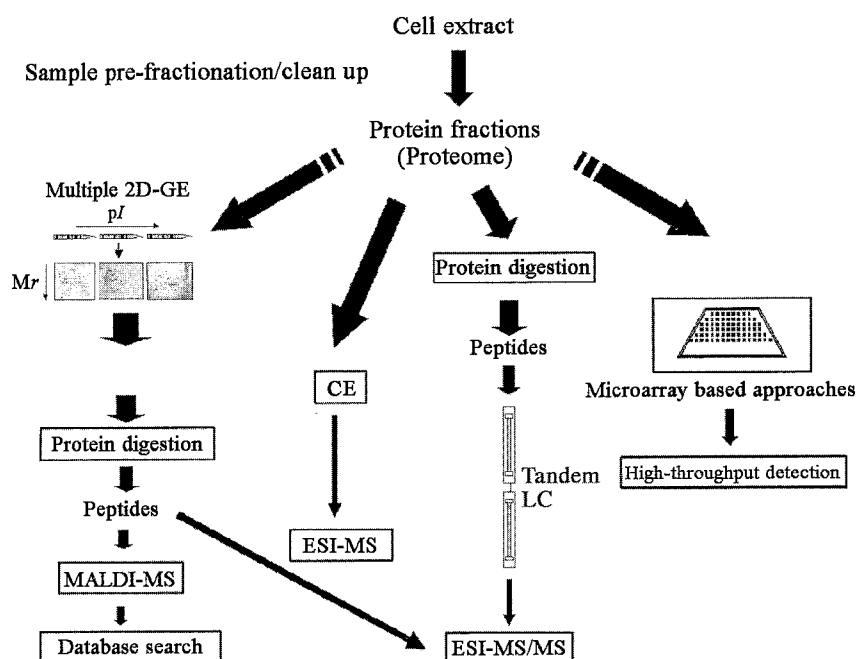
II. 2. 4. A proteomika gyakorlata

A fehérjék szeparálása és azonosítása alapján a proteomikai vizsgálatok általánosan 3 csoportba sorolhatók (Vaidyanathan és Goodacre, 2003):

- (a) a kétdimenziós gélelektroforézissel szeparált fehérjék azonosítása enzimes hidrolízis után tömegspektrometriával

- (b) a fehérjékből enzimés bontással előállított peptidkeverék elválasztása folyadék kromatográfiával (LC) vagy kapilláris elektroforézissel (CE), amit tömegspektrometriás azonosítás követ
- (c) mikroarray technikák

Az 1. ábra a proteom vizsgálatok általános kivitelezéseit mutatja.



1. ábra

A proteomikai vizsgálatok kivitelezési lehetőségei (Vaidyanathan és Goodacre, 2003)

II. 2. 4. 1. Kétdimenziós gélelektroforézis (2-DE)

A proteomika számos bonyolult módszert kombinál a fehérjék azonosítására és mennyiségi meghatározására (Godovac-Zimmermann és Brown, 2001, Dutt és Lee, 2000). Az elektroforézis nagy felbontóképessége, széleskörű alkalmazhatósága és a kíméletes reakciókörülmények miatt az egyik leggyakrabban használt technika a fehérjék elválasztására és azonosítására (Hajós és Idei, 2001). A proteom összetételét láthatóvá tévő legfőbb módszer a kétdimenziós gélelektroforézis (Link, 1999, Rabilloud, 2002), amellyel tipikusan 1000-2000 fehérje különböztethető meg. A fehérjék elválasztása első dimenzióban izoelektromos pont alapján, majd a második dimenzióban

molekulatömeg alapján történik. A 70-es években O'Farrell (1975) és Klose (1975) egyidőben, egymástól függetlenül alkalmazta elsőként a kétdimenziós technikát komplex fehérjeminták (testfolyadék, sejtek, szövetek, vagy organizmusok) szeparálására. Mind az izoelektromos fókuszálás, mind a molekulatömeg szerinti elválasztás denaturáló körülmények között történik. Az izoelektromos fókuszálás nagy karbamid koncentrációjú, nem-ionos detergenst tartalmazó oldat jelenlétében egy vékony, függőleges gélrúdban megy végbe, amit vertikális SDS-PAGE követ a második dimenzióban. Az ebben a formában nehezen kivitelezhető kétdimenziós elválasztás technikai problémáit Bjellqvist és mtsai. (1982) úgy oldották meg, hogy az elválasztást mindkét dimenzióban vízszintes rendszerben végezték. A 2-DE további problémái - a rossz ismétélhetőség, a nem megfelelő felbontás, illetve a szélsőségesen savas ($\text{pH} < 3$) vagy bázikus ($\text{pH} > 10$) fehérjék szeparálásának nehézségei - azonban az első dimenzióban végzett izoelektromos fókuszáláshoz kapcsolódtak. Mindezek feloldására fejlesztették ki az immobilizált pH gradienst (IPG) tartalmazó stripeket (gélcsíkot), ami poliakrilamid gélhez kovalensen kötött akrilamido (ImmobilineTM) pufferekből épül fel.

Kétdimenziós gélelektroforézis (2-DE) kivitelezése

A hagyományos izoelektromos fókuszálással összehasonlítva a 2-DE első dimenziójában végzett izoelektromos pont alapú elválasztás az alábbi tulajdonságokkal jellemezhető:

- nagy karbamid koncentráció (8-9 M) és nem-ionos detergens alkalmazása, a nagy viszkozitás miatt a fehérjék vándorlása lelassul. Ennek következménye a hosszú fókuszálási időtartam;
- a lehető legnagyobb pórusmérettel rendelkező gél használata nagy molekulatömegű fehérjék megfelelő szeparálására. Ezáltal a gélek kis mechanikai stabilitással rendelkeznek.
- reprodukálható pH gradiensek alkalmazása a gélben, amely javítja a gélek összehasonlíthatóságát.

Az izoelektromos fókuszáláshoz használt mintaoldó pufferek a következő összetevőket tartalmazzák: denaturáló szerek, nem-ionos detergens, redukáló szerek és brómfenolkék. A legáltalánosabb denaturáló reagens a karbamid, ami megszünteti a fehérje-fehérje kölcsönhatásokat, a fehérjék harmadlagos szerkezetét, növeli a hidrofób fehérjék oldhatóságát. A fehérjéket oldott formában a gélben tartó detergensek közül a legelterjedtebb a 3-[3-kolamidopropil]-dimetilammónium]-1-propánszulfonát (CHAPS), a Triton-X 100 és az SDS. Redukáló szerek pl.: DL-treo-1,4-dimerkapto-2,3-butándiol (DTT) alkalmazásával a fehérjék cisztein oldalláncai

egységesen redukált állapotba kerülnek. A brómfenolkék használatának legfontosabb célja az IEF hibáinak láthatóvá tétele.

Az IEF leggyakoribb kivitelezési módja a pH gradienst tartalmazó lágy gélben történő elválasztás, amikor a gél vékony fóliához polimerizálják és rászárítják. A száraz formában lévő géleket (strip) első lépésben rehidratálni kell, ami történhet mintával, illetve minta nélkül is.

A fehérjék molekulatömeg szerinti elválasztását a polipeptidek ekvilibrálása előzi meg. Ennek az elsődleges célja a fehérjék SDS-sel történő beburkolása és egységes pH kialakítása a strip teljes hosszában. Ezt a cisztein oldalláncok újbóli redukálása és alkilálása követi. A redukálás DTT-vel történik, amelynek célja a visszaalakult kénhidak megszüntetése. A második lépésben a redukált cisztein oldalláncokat jódecetsavval alkilálják. A jódecetsav alkalmazásának másik célja, a feleslegben lévő DTT megkötése a rendszerben. Az ekvilibráló oldat alapvető komponense a glicerol, amelynek alkalmazásával az elektroosmózis kiküszöbölhető.

A Laemmli (1970) technikájára épülő SDS-PAGE elválasztáshoz képest a 2-DE rendszerben alkalmazott SDS-PAGE módszerek két fontos különbséggel jellemezhetők:

- a hagyományos gyűjtőgél a strip helyettesíti, hiszen annyira lágy gél alkalmazunk, hogy tökéletesen képes azt pótolni;
- a stripeket a szeparáló gél tetejére kell „ragasztani” felolvasztott agaróz segítségével.

II. 2. 4. 2. Kétdimenziós gélelektroforézis (2-DE) alternatívái

A kétdimenziós gélelektroforézis nagy felbontóképessége ellenére a fehérjék bizonyos csoportjának elválasztására kevésbé alkalmas. A kis mennyiségben expresszálandó fehérjék, a nagyon savas ($\text{pH} < 3$) vagy bázikus ($\text{pH} > 10$) izoelektromos ponttal, illetve a 10 kDa-nál kisebb vagy a 150 kDa-nál nagyobb molekulatömeggel rendelkező fehérjék, a membránfehérjék és a hidrofób tulajdonsággal jellemezhető polipeptidek elektroforetikus elválasztása igen bonyolult. Az alulreprezentált fehérjék elválasztása előfrakcionálással vagy szűk pH tartományú stripek használatával kivitelezhető. Megfelelő detergenssek alkalmazásával a hidrofób karakterű fehérjék nagyobb hatékonysággal szeparálhatók (Rabilloud, 1998).

A 2-DE mellett a proteomikai vizsgálatokban számos kromatográfiás technika és a kapilláris elektroforézis alkalmazása is elterjedt. A kétdimenziós gélelektroforézissel nehezen szeparálható membránfehérjék például egydimenziós SDS-PAGE elválasztást követő LC-MS/MS vizsgálattal azonosíthatók. Pflieger és mtsai. (2002) ezzel a módszerrel 28 mitokondriális fehérjét határoztak meg *Saccharomyces cerevisiae*-ből. Különböző szőlők (6 *Vitis* fajta) és borok (Chardonnay,

Sauvignon Blanc) fajtaazonosítása - fehérje-térkép alapján - szintén megoldható folyadék kromatográfiás technikával (Flamini és De Rosso, 2006).

Tejsavó alapú italok fehérje-összetevőinek proteomikai vizsgálatát Huber és mtsai. (1999) kapilláris elektroforézis alkalmazásával végezték, az elválasztás után ESI-MS technikával azonosították a β -laktoglobulin B-t, β -laktoglobulin A-t és α -laktalbumint. A 2-DE technikával nehezen vizsgálható bázikus fehérjék elválasztására Simo és mtsai. (2004) kapilláris elektroforézis-tömegspektrometria (CE-MS) módszert dolgoztak ki. Vizsgálataikban az élelmiszerbiztonság szempontjából is fontos fehérje, a lizozim mennyiségi meghatározását végezték el. A borkészítés során a malolaktikus fermentáció megakadályozásának céljából adagolt fehérje ugyanis jelentős allergén.

A fehérjék kétdimenziós elválasztásán alapuló proteomikai vizsgálatokon kívül újabb és újabb módszerekkel bővül a proteom tanulmányozására alkalmas technikák köre. A MudPIT (Multi dimensional Protein Identification Technology) egyike ezen módszereknek. A fehérjekomplexet első lépésben specifikus enzimekkel, általában endoproteáz lysC-vel és tripszinnel bontják, majd az így kapott peptidkeveréket kromatográfiás módszerekkel szeparálják a tömegspektrometriás azonosítás előtt. Egy fehérje-, vagy egy peptidkeverék nagy felbontású szeparálása azonos vagy pedig különböző elválasztás-technikai módszerek kapcsolásával is kivitelezhető. *Saccharomyces cerevisiae* fehérje-térképét Wasburn és mtsai. (2001) multidimenzionális folyadék kromatográfiával és tandem MS technikával (LC-LC-MS/MS) készítették el. Tanulmányukban 1484 fehérjét detektáltak és azonosítottak, eredményesen határoztak meg membránfehérjéket és alulreprézentált polipeptideket is.

Mikroarray (csiptechnika)

A genomikai vizsgálatokban gyakran alkalmazott mikroarray technikák megjelentek a proteom analízisben is. A fehérje csiptechnika leginkább a fehérje-fehérje, az enzim-szubsztrát és a fehérje-metabolit kölcsönhatások tanulmányozására irányuló proteomikai vizsgálatokban terjedt el (Templin és mtsai. 2002). *Saccharomyces cerevisiae* kináz enzimjeinek aktivitását 17 szubsztrát jelenlétében követték nyomon Zhu és mtsai. (2000) ezzel a technikával.

II. 2. 4. 3. Fehérje-detektálási módszerek

Az elektroforetikus elválasztás után a szétválasztott és rögzített fehérje-komponensek detektálására alkalmazott általános módszerek a fehérjék festésén alapulnak. A poliakrilamid gélben

elválasztott fehérjék detektálására a hagyományos festési eljárások mellett egyre érzékenyebb, speciális igényeknek megfelelő detektálási módszerek is rendelkezésre állnak. A proteomikai vizsgálatokban a hagyományos festési eljárások közül legelterjedtebb a Coomassie Blue és az ezüst festék alkalmazása.

A Coomassie festésnek több száz módosított eljárása ismert (Neuhoff és mtsai., 1985). Gyakori használatának az oka, hogy egyszerű, olcsó, ugyanakkor tömegspektrométerrel kompatibilis festék. Az R-250 formáját ún. regresszív festési módszerrel alkalmazzák (Mamone és mtsai., 2005). Az eljárás első lépésében magát a poliakrilamid gél telítik a festékkel, majd többszöri mosási lépéssel halványítják a sötét háttérrel. A festék ugyanis erősebben kötődik a fehérjékhez, mint a gél mátrixhoz (Patton, 2002). A G-250 esetében ún. progresszív festési eljárást végeznek (Neuhoff és mtsai., 1988). Az általában tömény savat (TCA, foszforsav), ammónium-szulfátot és metanolt/etanolt tartalmazó koloid festékoldatban a koloid, illetve a diszperz formában jelen lévő festékrészecskék egyensúlyban vannak. A festés során a diszperz részecskék áthatolnak a mátrixon és a fehérjékhez kötődnek, a koloid részecskék viszont nem képesek a gélbe jutni, ennek eredményeként a háttér nem festődik.

Az ezüstoffestést 1979 óta alkalmazzák, a legérzékenyebb festési eljárások egyike. Hátránya viszont, hogy nem „végpontos” festés, tehát nem alkalmas mennyiségi analízisre. A poliakrilamid gél elsőként ezüstsóval telítik, majd eltávolítják a gél mátrixhoz kötött fémionokat és redukálják a fehérjéhez kötött ezüstöt. A proteomikai vizsgálatokban leginkább a Shevchenko és mtsai. (1996) által kidolgozott MS kompatibilis ezüstoffestési eljárás terjedt el (Wang és mtsai., 2005).

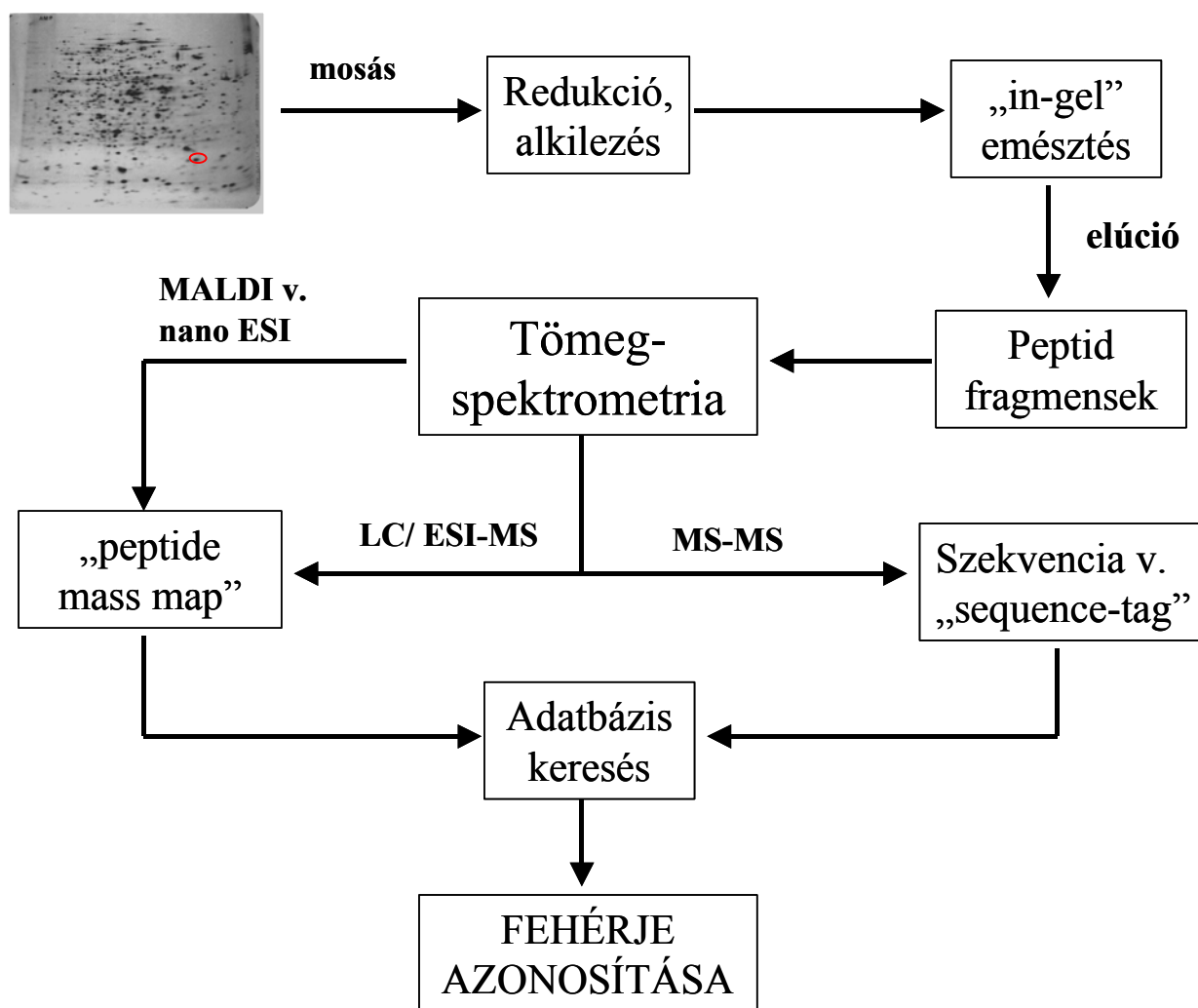
A fluoreszcens festékek közül a legelterjedtebb a SyproRuby (Lehesranta, 2006). Nagy érzékenységű (kb. 1 ng/fehérjefolt), mennyiségi analízisre alkalmas MS kompatibilis festék.

II. 2. 4. 4. Fehérjék azonosítása tömegspektrometriás technikával

A tömegspektrometriának számos alkalmazási lehetősége ismert a fehérjekémiában, úgymint: peptidek és fehérjék tömeg-meghatározása, izolált fehérjék (HPLC, PAGE) primer szerkezetének felderítése, poszt-transzlációs módosítások (acilezés, formilezés, amidálás, foszforilezés, szulfatálás, glikozilezés) detektálása, azonosítása és lokalizálása, fehérjebontási termékek, metabolitok azonosítása, fehérje-ligandum kötődések vizsgálata, enzimek aktív helyeinek felderítése, diszulfid hidak helyeinek feltérképezése valamint a proteomika.

A proteomikai vizsgálatokban az elválasztott fehérjék azonosítására, szekvenciájuk meghatározására napjainkban a nagy érzékenységű elektropray (ESI) és mátrixhoz kötött lézer ionizáció-repülési idő (MALDI-TOF) tömegspektrométereket alkalmazzák, a „peptide mass

mapping” és a tandem tömegspektrometriás (MS/MS) szekvenálási módszerekkel (Chapman, 2000, Winston és Fitzgerald, 1997) (2. ábra). A „peptide mass mapping” lényege (Henzel és mtsai., 1993), hogy a meghatározni kívánt fehérjét specifikus enzimmel (általában tripszinnel) vagy kémiai reagenssel fragmenseire bontják, redukálják, alkilálják majd közvetlenül (nano-ESI, v. MALDI) vagy HPLC-vel történt elválasztás után (LC-MS) tömegspektrométerrel meghatározzák az egyes peptidek tömegét. Ezek a peptidtömegek szolgálnak bemeneti adatként a számítógépes adatbáziskereső programban, amely teoretikusan hidrolizál minden, az adatbázisban lévő fehérjét az alkalmazott fragmentálási reakciónak megfelelően. A kísérletesen kapott tömegadatokat a számítógép összeveti az adatbázisban található összes fehérjéből származó peptidtömegekkel, a fehérje azonosítása céljából. Már 3-4 peptidtömeg elég lehet a fehérje meghatározására, azonban több adat csak növeli a találat megbízhatóságát. Mann és mtsai. (2001) szerint már egyértelmű az azonosítás, ha legalább öt peptidtömeg esetében lefedést tapasztalunk az azonosítani kívánt fehérje, illetve az adatbázisban megtalálható polipeptid peptidtömegei között és a szekvencia lefedettség minimum 15%. Ha eredményül több találatot kapunk, azaz nem lehet egyértelműen meghatározni, hogy melyik fehérjéről van szó, a tandem tömegspektrometriás eljárások segíthetnek pontosítani az eredményt. Ilyen eljárás a részleges aminosav-sorrend meghatározáson alapuló „sequence tag” módszer, amely megnöveli az adatbázisban történő keresés specificitását. A tömegspektrometriás „peptide mass mapping” gyorsasága és nagy érzékenysége miatt ma már nagyon elterjedt módszer fehérjék 2D gélből történő azonosítására.



2. ábra

Az elektroforetikusan elválasztott fehérjék azonosításának lehetséges módjai

A 90-es években számos kutató beszámol a MALDI ionizációs technika és a „peptide mass mapping” eljárás kombinálásáról, amelynek használata a korábbiaknál érzékenyebb és kiváló alkalmazási lehetőségekkel rendelkező fehérje azonosítási módszerhez vezetett (Geveart és Vandekerckhove, 2000). A vizsgált fehérje egyértelmű meghatározásához akár femtomol mennyiségű fehérje is elegendő.

MALDI ionizáció során a fehérje oldott vagy szuszpendált formában van egy kristályos mátrixban, ami szerves, UV-abszorbeáló vegyület. Ilyen pl.: a 2,5- dihidroxi-benzoészav, vagy az α -ciano-4-hidroxi-fahéjsav. A mátrix abszorbeálja az UV sugárzást és ionizálódik, „supercompressed” gázzá alakul, miközben disszociál és átadja a töltését a fehérjének. A mátrix óriási sebességgel kitér, magával ragadja a minta molekuláit, és töltést ad át nekik. A MALDI technikával ionizált molekulákat leggyakrabban repülési idő (TOF, time-of-flight) analizátorral határozzák meg. A

fehérjéket elektromos térben konstans feszültséggel gyorsítják, a detektorba érkezésüket így a tömegük határozza meg. Az ESI technikával összehasonlítva a MALDI-val végzett ionizációt nem zavarják a kis mennyiségben jelen lévő szennyező komponensek, ezáltal nem igényel bonyolult mintaelőkészítést.

A „peptide mass mapping” elemzés alapja, hogy a vizsgált fehérjéből előállított peptid tömegeket egy „virtuális” ujjlenyomathoz hasonlíttja, amely az adatbázisban megtalálható fehérje teoretikus hasításából ered. Ennek következtében egy adott fehérje azonosítását nagymértékben befolyásolja annak megléte az adatbázisban. Amennyiben a proteomikai vizsgálat olyan fajra terjed ki, melynek genomja vagy proteomja még egyáltalán nem vagy csak részben ismert, a meghatározás bonyolult. Ebben az esetben homológia alapján végezhető el az azonosítás. Joubert és mtsai. (2001) feldolgozóiparban használt sörélesztők fehérjéit tömegspektrometriás vizsgálat után az adatbázisban megtalálható *Saccharomyces cerevisiae* fehérjéi alapján homológia szerint eredményesen azonosították.

II. 3. Élelmiszerfehérjék vizsgálata proteomikával

A proteomikát alkalmazhatják fehérjék azonosítására különféle élelmiszer-mátrixokban, fehérje-fehérje kölcsönhatások tanulmányozására élelmiszeripari alapanyagokban és késztermékekben, illetve fehérjék és egyéb élelmiszer-összetevők kölcsönhatásának vizsgálatára.

A proteomika egyik speciális alkalmazási területe az élelmiszerek minőségét meghatározó komponensek elemzése. Sertéshús post mortem változásának molekuláris szinten történő nyomon követésével Lametsch és Bendixen (2001) meghatározták azt az izomfehérjét, amely a post mortem állapot során módosul.

Az élelmiszeripari technológiák gyors fejlődése, illetve az új technológiák megjelenése újabb és újabb alkalmazási területet nyújt a proteomikai vizsgálatok számára. Lehetőség nyílik a különböző eljárások élelmiszerfehérjék összetételére gyakorolt hatásainak nyomon követésére is.

II. 3. 1. Allergén élelmiszerfehérjék

Az élelmiszer-tudomány számára az élelmiszerallergia egyre inkább előtérbe kerülő terület. Az allergiás megbetegedések száma a legújabb adatok alapján (EU hírlevél, 2002) rohamosan nő, körülbelül 50 millió európai szenved az allergia valamilyen formájában. Ezt valószínűleg a genetikai és a környezeti hatások együttesen eredményezik. Környezeti hatások között elsősorban is az élelmiszerek, az élelmiszerfehérjék okozzák. Az élelmiszerallergia a szervezet egyéni, megváltozott reakcióját jelenti bizonyos élelmiszerekkel szemben. Sok erőfeszítés történt az

élelmiszerfehérjék allergén aktivitásának meghatározása, előrejelzése érdekében a már ismert allergének közös fiziko-kémiai tulajdonságainak megállapítására és azon szerkezeti sajátosságok értelmezésére, melyeket az IgE antitestek felismernek. Aalberse és Stapel (2001) az ismert szerkezetű élelmiszer allergéneket öt csoportba sorolták a fehérjék harmadlagos szerkezete alapján.

1. anti-paralel β -szerkezetű:
 - szérin proteázok (tripszin)
 - szója KTI
2. anti-paralel β -szerkezetű egy vagy több α -helix asszociációjával rendelkező
 - β -laktoglobulin (tej)
3. α és β szerkezetű (nem szoros asszociáció)
 - lizozim
 - laktalbumin
4. α -helikális
 - nem specifikus lipid transzfer fehérjék
 - 2S albuminok (magok)
 - parvalbuminok (halak)
5. egyéb szerkezetek
 - szérin proteáz inhibitor (ovalbumin)
 - amiláz
 - tropomiozin
 - kis fehérjék

Azt a következtetést vonták le, hogy a fehérje allergének nem rendelkeznek általánosítható, különleges, háromdimenziós szerkezeti vonásokkal, csak azzal a képességgel, hogy el tudják érni és stimulálni képesek az immunsejteket és a hízósejteket. Az allergéneket funkciójuk alapján is osztályozták (Breiteneder and Ebner, 2000). Meglepő módon a növényi eredetű élelmiszer allergének közül soknak hasonló vagy azonos a szerkezete a „pathogenesis-related proteins”, a PR-fehérjék (patogenezissel összefüggésbe hozható fehérjék azok, amelyek kórokozók, sérülés vagy bizonyos környezeti stresszek hatására keletkeznek) szerkezetével. A PR-fehérjék csoportjaiba nem sorolható allergének is többnyire jól ismert fehérjecsaládok tagjai, melyek meghatározott biológiai funkcióval rendelkeznek.

Az allergiát okozó alapvető élelmiszerek többsége növényi eredetű (gabonafélék, hüvelyesek, továbbá a mogyoró és a diófélék). Ebből az következik, hogy néhány speciális fehérje felelős az élelmiszerallergiáért. Jogosan vetődhet fel az a kérdés, hogy miért ezek a fehérjék és miért nem mások válnak allergénekké.

Azok a fehérje allergének, melyek a tápcsatornán keresztül idézik elő a reakciót, két, szerkezetileg rokon szupercsaládba sorolhatók (Shewry és mtsai., 2002). Egyik a prolamin szupercsalád, ebbe tartoznak a gabonák prolamin tartalék fehérjéi, nem-specifikus lipid transzfer fehérjék, tripszin- és amiláz inhibitorok, 2S albuminok. A másik a cupin szupercsalád a 11S és 7S globulin tartalék fehérjékkel. A többi élelmiszerallergén az ún. kereszt-reaktív allergia szindrómáért felelős. A szerkezet és allergénitás kapcsolatáról tudjuk, hogy azok az allergének, melyek a tápcsatornán keresztül hatnak (prolamin és a cupin), túlélnek a hasítási folyamatokat: stabilak a gyomor alacsony pH-ján, rezisztensek (részben) a proteolízisre, és az epesók denaturáló hatására.

Az allergén élelmiszerfehérjék vizsgálata - az élelmiszer-tudomány szempontjából is - a proteomika egyik fontos alkalmazási területe.

Beyer és mtsai. (2002) szezámag fehérjeinek elektroforetikus elválasztása után alkalmazott speciális immun-technikával meghatározták, és szekvenáltak négy allergén fehérjét, ami hozzájárulhat a rekombináns allergének előállításához, illetve az IgE-kötő epitópok azonosításával a keresztreakciók előrejelzéséhez.

Natale és mtsai. (2004) a tehéntej fehérjeinek allergén jellegét vizsgálták 2-DE szeparálás után immunblot technikával. A vizsgált fehérjék IgE-kötő képességét 20 betegből származó tejallergia pozitív szérum felhasználásával követték nyomon. A különböző tejfehérje komponensek in vivo körülmények között eltérő mértékű immun-reaktivitást mutattak, így pl. az $\alpha(s1)$ -kazein, az $\alpha(s2)$ -kazein, a β -kazein és a κ -kazein a vizsgálatba vont egyének 55%-, 90%-, 15%-, illetve 50%-ánál adott immunválaszt. Ez az érték közel 50% volt a β -laktoglobulin, a BSA és a laktoferrin fehérjék esetében. Az előzőektől eltérő módon az α -laktalbumin az adott körülmények között nem mutatott IgE-kötő képességet.

Az ismert földimogyoró allergén Ara h 1 fehérje rutinszerű kimutatását modell élelmiszer mátrixban (jégkrém) Shefcheck és Musser (2004) proteomikai módszerekkel valósították meg. A folyadék kromatográfiás elválasztást követő MS/MS technikával az allergén fehérje detektálásának kimutatási határa 10 mg/kg volt.

Kitta és mtsai. (2006) az alacsony molekulatömeggel rendelkező allergén búzafehérjék 2-DE szeparálását a hagyományos TRISZ-glicin rendszer helyett ecetsav-karbamid alkalmazásával végezték. Eredményeik szerint 3 fehérje esetében detektáltak erős immunválaszt, MALDI-MS vizsgálat alapján a következő fehérjéket azonosították: α -amiláz/tripszin inhibitor CM16 és CM17 prekuzora és egy lipid transzfer fehérje.

II. 3. 2. Stressz-fehérjék és allergia

A növényekben bizonyos környezeti hatásokra (fertőzés, növényvédő-szerek alkalmazása, UV sugárzás, fagyás, szárazság, gombák, rovarok) olyan fehérjék termelődnek, amelyeknek a védelmi funkció ellátásában van szerepük. Ezeknek az elsősorban antimikrobiális hatású, úgynevezett stressz-fehérjéknek nagy jelentősége van a növények életében, mert a denaturált vagy részlegesen denaturált fehérjéket kiszűrik és helyreállítják. Jelentős a szerepük a regenerációs folyamatokban, ugyanis segítik a sejt belső membránjain keresztülhaladó fehérje-transzportot és védik a sejtet, azaz molekuláris „chaperon”-ként, dajkafehérjeként viselkednek.

A stressz-fehérjék élelmiszerbiztonsági megítélése azonban összetettebb, mert jelentős élelmiszer allergének, az élelmiszeripari eljárások során többnyire megőrzik allergén aktivitásukat, és fogyasztásuk egészségügyi kockázattal járhat. A stressz-fehérjék savval, enzimes emésztéssel szemben ellenállóak, többségük igazoltan potenciális allergén karakterű.

II. 3. 3. Génmódosítás

A génmódosított termékek esetében elvárás (EU szabályozás), hogy az új termékek legalább olyan biztonságosak legyenek, mint a hagyományosak. Ez azt jelenti, hogy egyetlen új termék sem lehet allergén, ha élelmiszer-összetevőként alkalmazzák. Ha az új gén allergén eredetű (pl. mogyoró), akkor igazolni kell (pullozott szérumokkal), hogy az új fehérje nem mutat allergén aktivitást. Amennyiben az új gén nem allergén eredetű, akkor azt kell bizonyítani, hogy az ismert allergénnel nem mutat homológiát a fehérje szerkezete. A rekombináns DNS technika elterjedése miatt alapvetően fontos az új fehérjék allergén aktivitásának felmérése. Nem várt génexpresszió következtében megjelenő új fehérje allergénitász vizsgálatát minden új növény esetében célszerű elvégezni.

Az EU egyik multidiszciplináris projektje (GMOCARE) a GM növények élelmiszerbiztonsági megítélésével foglalkozik. Célkitűzésük annak megállapítása, hogy a genetikai módosítás okozhat-e előre nem tervezett változásokat a GM növényekben. A hagyományos és a GM paradicsom, illetve burgonya összehasonlító vizsgálatát sokirányú megközelítéssel, a genom, a proteom és a metabolom komplex tanulmányozásával és értékelésével érik el.

A lényegi egyenértékűség tanulmányozásának Corpillo és mtsai. szerint (2004) egyik lehetséges módja az expresszáladott fehérjék proteomikai vizsgálata. Munkájuk során a génmódosított (vírus-rezisztens) és szülői paradicsom fehérje-térképének összehasonlító elemzését elvégezve az adott kísérleti körülmények között sem mennyiségi, sem minőségi eltérés nem volt detektálható.

II. 4. Gabonafehérjék vizsgálata proteomikával

Széleskörű proteomikai vizsgálatok a rizs proteomjának tanulmányozása során készültek. A rizsszem különböző szöveteiből, a növény leveléből, gyökeréből 2500-nál több fehérje azonosítására került sor (Koller és mtsai., 2002).

A búza hatalmas genommérete miatt a közeljövőben még nem várható a teljes genom szekvenálása, a fehérjék esetében az NCBI adatbázis csak 2250 búzafehérje szekvenciát tartalmaz.

A búzafehérjék proteomikai vizsgálatának az egyik legfontosabb területe, a tézsza kialakításában részt vevő polipeptidek tanulmányozása. Figyelembe véve, hogy a proteomika jelenlegi eszközei nem teszik lehetővé a fehérjék negyedleges szerkezetének vizsgálatát, ezért azon fehérjék meghatározása a cél, amelyek szerepet játszanak a glutént kialakító fehérjék szintézisében és a diszulfid-kötések kialakításában ilyen, pl. a fehérje-diszulfid izomeráz (Shewry, 1999).

Andon és mtsai. (2002) elkészítették a búza amiloplasztjának fehérje-térképét a keményítő szintézis és a keményítő tárolás megismerésének céljából. Száznolcvanöt fehérjét szeparáltak pH 5-8, illetve 6-11 tartományban kétdimenziós elektroforézissel. Funkciójuk alapján csoportosították a fehérjéket és megkülönböztettek szénhidrát metabolizmusban, fehérje transzportban, riboszomális szabályozásban és védő mechanizmusban részt vevő polipeptideket.

Néhány tanulmány foglalkozik a búzafehérjéket, elsősorban az endosperm polipeptideket kódoló gének kromoszomális elhelyezkedésének meghatározásával (Islam és mtsai., 2002 illetve 2003). A gabonák minőségének javítását célzó nemesítési stratégiák az elmúlt évtizedekben leginkább a genetikai háttér vizsgálatával, nukleotid szekvenciák, genetikai térképek és DNS markerek meghatározásával foglalkoztak. A különböző biológiai hatások - a fehérjék stabilitása, poszt-transzkripcionális, kotranszlációs és degradatív módosulásai - különböző környezeti faktorokkal együtt befolyásolják a fehérjék expresszióját. Mindezek alapján egy adott sejt genetikai állományából nem következtethetünk egyértelműen a proteomra.

A búzafehérjék fajtaazonosítási vizsgálatait többnyire az endosperm tartalék fehérjék alapján végzik. A vizsgálatok legelterjedtebb módszerei a gélelektroforézis, a kapilláris elektroforézis, illetve a reverz-fázisú HPLC. Irodalmi adatok szerint a proteomikai vizsgálatok alkalmazhatók fajtaspecifikus búzafehérjék meghatározására. Japán és kanadai búzafajták, valamint az ezekből készített különböző lisztkeverékek fehérje-térképének összehasonlító proteomikai elemzésével fajtaspecifikus markereket határoztak meg Yahata és mtsai. (2005).

A proteomika gabonakutatásban történő alkalmazásának az egyik fontos területe a környezeti stressz gabonafehérjékre gyakorolt hatásának vizsgálata. Amennyiben a búza érése alatt a hőmérséklet néhány napon keresztül 30 °C fölé emelkedik, gyengébb minőségű tézsza állítható elő a gabonából (Blumenthal és mtsai., 1995). Skylas és mtsai. (2002) hőérzékeny (Wyuna), illetve

hőtűrő (Fang) búzák fehérje-összetételének változását követték nyomon hőstressz hatására az érés során, valamint tésztakélesztési kísérletet is végeztek. Eredményeik szerint az érzékeny Wyuna búzából készített tészta minőségét a hőstressz negatívan befolyásolta. A várakozásnak megfelelően a toleráns búza esetében ezt nem tapasztalták. A kétdimenziós fehérje-térképek összehasonlító vizsgálata alapján kimutattak és azonosítottak 7 olyan polipeptidet, amely az adott hőstressz hatására csak a toleráns búzában volt detektálható. Ezen fehérjék markerként szolgálhatnak a nemesítők számára a hőtoleráns fajták kiválasztásában.

A nagy hőmérséklet (34 °C) hexaploid búza fehérje-összetételére gyakorolt hatását tanulmányozták Majoul és mtsai. (2003 illetve 2004). A 2003-ban publikált munkájukban az endosperm fehérjék változását követték nyomon. A kontroll és stresszhatásnak kitett érett búzaszem kétdimenziós fehérje-térképének összehasonlító vizsgálata alapján 37 különbségfehérjét detektáltak, ebből tömegspektrometriás elemzést követően 23 polipeptidet határoztak meg. Az azonosított fehérjék közül 22 fehérje (különböző metabolikus enzimek, hő-sokk fehérjék) mennyisége szignifikánsan növekedett a hőstressz hatására, míg 1 fehérje esetében csökkenés volt kimutatható. A keményítőszintézisben részt vevő glükóz-1-foszfát adeniltranszferáz mennyiségének csökkenése magyarázat lehet a nagy hőmérséklet hatására bekövetkező gabonaszem-tömegvesztésnek. A szerzők 2004-ben megjelent munkájában az albumin és globulin fehérjék változását tanulmányozták hasonló körülmények között. A proteomikai vizsgálat alapján a stresszelt mintában 16 fehérje mennyisége szignifikáns növekedést, míg 8 fehérje mennyisége szignifikáns csökkenést mutatott a kontroll mintához képest. Az azonosított különbségfehérjék közül a kis molekulatömeggel rendelkező hő-sokk fehérjék, illetve a különböző enzimek (aldóz reduktáz, β -amiláz) esetében tapasztaltak mennyiségi növekedést. Korábbi eredményüket alátámasztva, a hőstressz hatására kisebb mennyiségben expresszáldó fehérjék között ismét kimutatták a glükóz-1-foszfát adeniltranszferázt.

A fehérje expressziót a búza érése során Skylas és mtsai. (2000) vizsgálták kétdimenziós elektroforézissel. A még fejlődési fázisban (17 DPA) lévő, illetve a már érett búzaszem endosperm fehérjéit szeparálták, majd Edman mikroszekvenálást követően adatbázis alapján azonosították azokat. Az elektroforetikus elválasztás után 321 fehérjét vizsgáltak, ebből 177 (55%) polipeptidet sikerült azonosítani. Az érés kezdeti szakaszában (17 DPA) lévő búza legnagyobb mennyiségben tartalék fehérjéket, az α -amiláz inhibitor és az α -amiláz/tripszin inhibitor család tagjait tartalmazza. Az eltérő mennyiségben expresszáldó polipeptidek közül a szerzők 2 fehérjét emeltek ki. A fehérje-diszulfid izomeráz enzim egyes izoformjai már nem mutathatók ki az érett magban, illetve a 60S riboszómafehérje mennyisége jelentős csökkenést mutat az érés során.

A búza endospermjében alulreprzentált albumin és globulin fehérjék expressziójának érés során végbemenő változását Vensel és mtsai. (2005) követték nyomon. Az azonosított fehérjéket

funkciójuk alapján csoportosítva megállapították, hogy az érés korai szakaszából (10 DPA) származó búzában a szénhidrát metabolizmus, a transzkripció/transzláció és a fehérjeszintézis folyamatai a meghatározók, amelyeket a nitrogén metabolizmus, a protein turnover, a sejtosztódás, a jel transzdukció és a lipid metabolizmus követ. Az érett (36 DPA) gabonaszemben szintén meghatározó a szénhidrát metabolizmus és a fehérjeszintézis, de a legfontosabb a stressz- és a védőfehérjék valamint a tartalékfehérjék szerepe.

III. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

III. 1. Anyagok

III. 1. 1. A vizsgált minták

Hereward köztermesztésbe vont búza (Anglia)

'CY-45' tavaszi búza (szülői vonal) és 'T-117', 'T-106-3/a', 'T-128' *bar* génre transzformált vonalak, 2004-es évjárat (Gabonatermesztési Kutató Kht.)

Marko tritikále, 2005-ös évjárat (Gabonatermesztési Kutató Kht.)

Scarlett, Jubilant, Pasadena, Mandolina tavaszi árpafajták, 2004-es évjárat (Gabonatermesztési Kutató Kht.)

Shewanella hanedei baktérium (Belgium)

III. 1. 2. Vegyszerek

A mérések során alkalmazott analitikai tisztaságú oldószerek és vegyszerek a Reanal Finomvegyszergyár Rt, a Bio-Rad Magyarország Kft, a Sigma-Aldrich Kft, az Amersham Biosciences, Genomic Solutions és a Merck Kft termékei.

Szérumok, antitestek:

Az immunblot vizsgálatokhoz gabona-allergia, illetve cöliákia pozitív humán szérumok kerültek felhasználásra.

III. 2. Módszerek

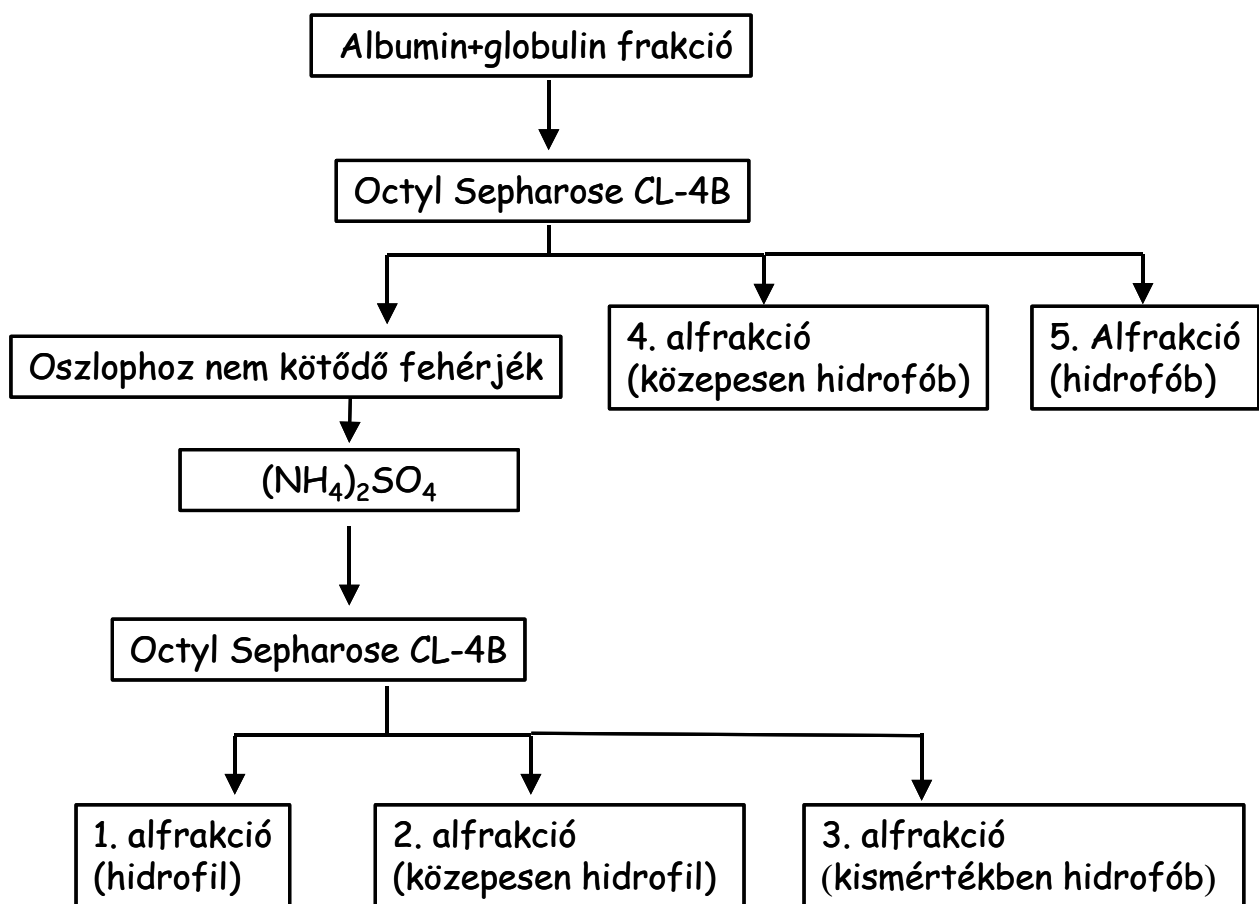
III. 2. 1. Hereward búza fehérjéinek proteomikai vizsgálata

III. 2. 1. 1. Búzafehérjék oldhatóság szerinti frakcionálása

Munkánk során az Osborne-szerinti frakcionálást alkalmaztuk, azzal a módosítással, hogy a víz- és só-oldható frakciót (albumin-globulin) együtt nyertük ki a búzalisztból. A frakciók fehérje tartalmát Bradford módszerrel mértük.

III. 2. 1. 2. Búzafehérjék hidrofób tulajdonság szerinti szeparálása

A víz- és só-oldható fehérjéket hidrofób jellegük alapján 5 alfrakcióra szeparáltuk Octyl Sepharose CL-4B oszlopon (Amersham Biosciences) 2 lépésben (3. ábra). Az oszlop ekvibrálását desztillált vízzel végeztük. A kromatográfiás elválasztás első lépésében a minta injektálása után az oszlophoz nem kötődő fehérjéket desztillált vízzel mostuk le. Majd etilén glikollal (50%; v/v) eluáltuk a közepesen hidrofób (4. alfrakció), illetve karbamiddal (7 M) a leginkább hidrofób (5. alfrakció) fehérjéket. Ezt követően az oszlopról desztillált vízzel lemosott fehérje frakcióhoz ammónium-szulfátot adagoltunk, 1,2 M koncentráció eléréséig. Az így nyert fehérjeoldatot az elválasztás második lépésében ugyanazon az Octyl Sepharose oszlopon szeparáltuk további alfrakciókra. Ammónium-szulfátos (1,2 M) ekvibrálás után ammónium-szulfáttal eluáltuk a hidrofil (1. alfrakció), desztillált vízzel a közepesen hidrofil (2. alfrakció) és etilén glikollal (50%; v/v) a kismértékben hidrofób (3. alfrakció) fehérjéket.



3. ábra

A hidrofób kölcsönhatási kromatográfia lépései

III. 2. 1. 3. Búzafehérjék szeparálása egydimenziós gélelektroforézissel

A molekulatömeg szerinti elválasztást NuPAGE Bis-Tris 12% akrilamid tartalmú gélben (Invitrogen) végeztük. A mintaoldáshoz NuPAGE LDS 4X (Invitrogen) mintaoldó puffert és NuPAGE 10X (Invitrogen) redukáló ágenst alkalmaztunk, amellyel 0,03 mg/ml fehérje koncentrációt állítottunk be. Az elektroforézishez NuPAGE SDS (Invitrogen) puffert használtunk.

Elektroforézis paraméterei:

feszültség (konstans): 200 V

áramerősség (limit): 200 mA

futtatás ideje: 50 perc

Fehérjedetektálás

A fehérjéket ezüst festési eljárással detektáltuk SilverXpress® Silver Staining Kit (Invitrogen) alkalmazásával, a gyártó szerinti protokollt követve.

III. 2. 1. 4. Búzafehérjék szeparálása kétdimenziós gélelektroforézissel

A búzafehérjéket (+/- 100µg) első dimenzióban pH 3-10 vagy pH 6-11 tartományban fókuszáltuk. A stripeket (Amersham Biosciences) egy éjszakán keresztül rehidratáltuk 7 M karbamidot, 2 M tiokarbamidot, 2% CHAPS-t, 0,5%(v/v) amfolitot pH 3-10 vagy pH 6-11, 0,28% DTT-t, 0,001% brómfenolkéket tartalmazó pufferban. Az izoelektromos fókuszálást 11 mA/strip áramerősségen, 80 000 Vh felvételéig végeztük 5000 V maximumon. A második dimenzió előtt a stripeket equilibráltuk 3 M karbamidot, 3,3% SDS-t és 30% glicerolt tartalmazó 0,2 M Trisz-acetát pufferben (pH: 8,8) első lépésben 0,8% DTT jelenlétében 30 percig, majd 2,5% iodoacetamid jelenlétében szintén 30 percig. A második dimenzióban a fehérjéket 28 x 23cm x 1mm 10% SDS-PAGE gélben szeparáltuk 500V feszültségen, 20W/gél mellett 4 óra alatt, 0,2 M Trisz, 0,2 M Tricin, 0,4% SDS tartalmú katód pufferben és 0,13 M Trisz-acetát anód pufferben.

Szeparáló gél (10%, 6 nagy gélre):

Duracryl 30,65% Bis (Genomic Solution)	222 ml
1,5 M TRISZ-HCl (pH: 8,8)	166 ml
10% SDS	7 ml
Desztillált víz	274 ml
TEMED	0,335 ml
Ammónium-perszulfát (100 mg/ml)	1,7 ml

Fehérjedetektálás

A molekulatömeg szerinti elválasztás után a fehérjéket egy éjszakán keresztül fixáltuk 40% metanolt, 10% ecetsavat tartalmazó oldatban. A fehérjéket Sypro Ruby (Bio-Rad) festékkel detektáltuk. A gél 90 percig rázattuk a festékoldatban, majd 10% metanol, 6% ecetsav oldattal távolítottuk el a háttérben maradt felesleges festéket. A gélképeket proXPRESS Proteomic Imaging System (Perkin Elmer Life Sciences) készülékkel rögzítettük.

III. 2. 1. 5. Fehérjeazonosítás MALDI-MS alkalmazásával

In situ emésztés

A fehérje-foltok kivágását ProPick Spot Picker készülékkel HT Analyzer software (Genomic Solutions) segítségével végeztük, a tripszines emésztést pedig ProGest Protein Digester (Genomic Solutions) készülékben. Első lépésben 200 mM ammónium-bikarbonát/50 % acetonitril oldattal eltávolítottuk a Sypro Ruby festéket a gélből, majd 25 mM ammónium- bikarbonát oldattal egyensúlyoztuk. A fehérjét 37°C-on, 3 órán keresztül hidrolizáltuk 50ng tripszin (Promega) hozzáadásával, a reakciót 5% hangyasavval állítottuk le. A mintákat –70°C-on tároltuk a tömegspektrometriás analízisig.

MALDI-MS

A fehérjeminták tömegspektrometriás elemzését a John Innes Centre (Norwich, UK) intézetében végezték Bruker Reflex III MALDI-TOF MS készüléken (Bruker-Daltonics, Bremen, Germany) pozitív ion reflektor módban.

A fehérjét peptidtömegek alapján az NCBI Mascot programjával (Matrix Science; <http://www.matrixscience.com/>) azonosítottuk. A keresési paraméterek a következők voltak:

- taxonómia: zöld növények,
- felhasznált enzim: tripszin,
- fix módosítás: ciszteinek karbamidometilezése,
- változó módosulás: metionin oxidációja,
- tömeg tolerancia: 50 ppm

III. 2. 2. Szülői és transzgénikus búza vonalak fehérjéinek proteomikai vizsgálata

III. 2. 2. 1. Növényi anyag, szövetkultúra és transzformáció

(Halász és mtsai., 2007)

A genetikai transzformációs kísérletek recipiens genotípusa a 'CY-45' tavaszi búza volt, amit a szomatikus szövetkultúrában adott fokozott válasz miatt már korábban szelektáltak. A donor növényi anyagot standard búzatermesztő program szerint fitotron kamrákban és üvegházban

termesztették. Az anthesis 12. napja után az éretlen embriókat a korábban leírt módon kimetszették. Kallusz indukcióhoz D₂ közeget használtak. A szelekcióban, a bombázott kallusz anyag első és második ciklusa alatt a D₂ közeget 5 és 10 mg/l bialaphos-szal (Shinyo Sangyo Co., LTD) egészítették ki, külön-külön. A kiválasztott szomatikus búza kallusz kultúrából a feltételezett transzformánsok regenerálását egy korábban publikált protokoll szerint végezték.

A kallusz anyagból származó három hetes embriókat alkalmazták genetikai transzformáció céljára. A transzformációs rendszer optimalizálásához tranziens expressziós kísérleteket végeztek az *Uida* riporter gént és a *bar* markergént tartalmazó pAHC25 plazmiddal. A stabil transzformációs kísérletekben a herbicid (Finale 14SL, 150 g/l ammónium glufoszinát) rezisztenciára választható *bar* gént tartalmazó pAHC20 plazmidot alkalmazták. A regenerált növényeket fitotron kamrába transzplantálták és a transzformált gént (*bar*) 0,5 % Finale 14SL permetezéssel és Southern blot analízissel ellenőrizték. A 'T-117', 'T-106-3/a' és 'T-128' transzgénikus búza vonalak egy integrációs helyű transzformánsok. Ezek a vonalak következésképpen önbeporzók és a generációk mindegyike herbicid (Finale 14SL) kontrol alatt fejlődött. Mindezek a transzgénikus vonalak: 'T-117', 'T-106-3/a' és 'T-128' T₄ generáció után teljesen homogének voltak a transzformált *bar* génre.

Üvegházi kísérletek

A szárazság-stressz beállítása a szülői 'CY-45' és a transzgénikus vonalakra 'T-117', 'T-106-3/a', 'T-128' 2003 márciusában, üvegházban történt. A növény optimális fejlődéséhez elegendő vízmennyiségének egyharmadával látták el a vizsgált búza vonalak kéthetes növénykeit. A magérés idején (június, július) az üvegházban 30-35 C°-ot mértek.

A szárazság-stressz hatására a búza vonalak termékenysége csökkent. A szülői 'CY-45' és a transzgénikus vonalakból 'T-117', 'T-106-3/a', 'T-128' 24-24 növényt arattak le.

III. 2. 2. 2. Búzafehérjék oldhatóság szerinti frakcionálása

Munkánk során az Osborne-szerinti frakcionálást alkalmaztuk, azzal a módosítással, hogy a víz- és só-oldható frakciót (albumin-globulin) együtt nyertük ki, a vizsgált minták szemcsemérete 0,15 mm alatti volt. A frakciók fehérje tartalmát Bradford módszerrel mértük.

III. 2. 2. 3. Kétdimenziós gélelektroforézis

Az első dimenzióban a fehérjéket izoelektromos pontjuk alapján szeparáltuk immobilizált pH gradienst tartalmazó stripen. A mintákat rehidratáló pufferben oldottuk (8 M karbamid, 1% CHAPS, 20 mM DTT), majd 150 µg fehérjét vittünk fel a 17 cm-es stripekre, aktív rehidratálást követően 60 000Vh felvételéig fókuszáltuk BIO-RAD PROTEAN IEF CELL készüléken. A molekulatömeg szerinti poliakrilamid gélben történő elválasztás előtt a stripeket equilibráltuk karbamidot (6 M), SDS (2%) és glicerolt (20%) tartalmazó Trisz-HCl pufferben első lépésben DTT (130 mM) jelenlétében 20 percig, majd jódacetamid jelenlétében (135 mM) szintén 20 percig. Második dimenzióban a fehérjéket vertikális SDS-PAGE-n BIO-RAD PROTEAN II xi Cell készüléken szeparáltuk.

Fehérjedetektálás

A molekulatömeg szerinti elválasztást követően Coomassie Blue R-250-el detektáltuk a fehérjéket. Az elektroforézis befejezése után a szeparált fehérjéket 20 percig fixáltuk 20% triklórecetsav oldatban. A maradék TCA eltávolításához 3-szor 10 percig rázattuk a géleket PAGE-mosó oldatban (10% etanol, 5% ecetsav). Ezután 10 percig Coomassie festékoldatban (0, 2% Coomassie R-250, 45% etanol, 9% ecetsav) rázattuk a gél, majd 10% ecetsav oldattal távolítottuk el a háttérben maradt felesleges festéket. A kapott géleket *Gel Doc 2000* (Bio- Rad) rendszerrel dokumentáltuk.

III. 2. 2. 4. Fehérjeazonosítás MALDI-MS alkalmazásával

In situ emésztés

A gélből kivágott (manuálisan) mintákból első lépésben eltávolítottuk a Coomassie festéket, háromszor átmostuk 25 mM ammónium-bikarbonát/50% acetonitril oldattal (10 percig), majd eltávolítottuk a felülúszót. A fehérjéket az enzimes hidrolízis előtt redukáltuk (25µl, 10 mM DTT/25 mM ammónium-bikarbonát, 0,5 h, 56°C), majd alkiláltuk (25µl, 55 mM jódacetamid/25 mM ammónium-bikarbonát, 30 min, szobahőmérséklet). A mintákhoz 100 ng tripszint (sequencing grade, modified trypsin, Promega GmbH, Mannheim, Germany) tartalmazó 20 µl puffert (50 mM ammónium-bikarbonát) adtunk, a hidrolízist 37°C-on (4 óra) végeztük. A tömegspektrometriás analízis előtt ZipTipC18 tisztítást végeztünk (Millipore, Bedford, MA, USA).

Fehérjeazonosítás tömegspektrometria segítségével

A MALDI TOF MS vizsgálatot DHB mátrix (2,5- dihidroxi-benzoészav) jelenlétében végeztük. A mérést Bruker Reflex III MALDI-TOF MS készüléken (Bruker-Daltonics, Bremen, Germany) pozitív ion reflektor módban végeztük. A tripszin autolízis termékeit használtuk belső kalibrációhoz.

A fehérjét peptidtömegek alapján az NCBI Mascot programjával (Matrix Science; <http://www.matrixscience.com/>) azonosítottuk. A már a III. 2. 1. 5. pontban ismertetett paraméterek alapján. Néhány esetben kiegészítő analízisre került sor MS Fit programmal (UCSF; <http://prospector.ucsf.edu/>).

MALDI Ion-trap MS/MS analízishez a mátrix, CHCA (α -ciano-4-hidroxi-fahéjsav) és a szolvens (24% izopropanol, 75% víz, 1% ecetsav) 1:1 arányú keverékét alkalmaztuk. A méréseket Agilent atmospheric pressure MALDI (AP-MALDI II) ionforrással felszerelt Agilent XCT Plus ion trap MS analizátoron végeztük.

III. 2. 2. 5. Elektroforetikus blot technika és immunreakció

A blottolás a fehérjék szintetikus membránon történő megkötését jelenti, amelyet a membránon specifikus detektálás követ. A leghatékonyabb blottolási technika, amit Western módszernek neveznek, alkalmazása során első lépésben a fehérjét elektroforetikusan választják el. Az így kapott felbontás a membránon is stabil marad, ami a módszer nagy előnye.

Az elektroforetikus elválasztás után a poliakrilamid gélt és a 0,45 μ m pórusméretű nitrocellulóz membránt (Bio-Rad) 25 mM TRISZ-t, 192 mM glicint, 20% metanolt, és 0,1% SDS-t tartalmazó Towbin pufferben 10 percig equilibráltuk. Az SDS-poliakrilamid- gélelektroforézissel szeparált fehérjefrakciókat BIO-RAD Trans Blot SD Semi-Dry Transfer Cell készülékkel nitrocellulóz membránra vittük át. A blottolási idő 90 perc a blottolási feszültség 25 V, az áramerősség pedig 0,8 mA/cm² volt. Az immunreakciókhoz humán szérumokat használtunk. A vizsgálatokhoz felhasznált humán szérumok klinikailag igazolt háttérű gabona-allergiás betegektől származtak.

Az immunfestés lépései a következők voltak:

- 5 perc fixálás 25% glutáraldehidet tartalmazó mosó-inkubáló pufferben
- 30 perc inkubálás fedőpufferben (2% Tween-20 mosó- inkubáló pufferben oldva)
- 3 x 10 perc mosás (mosó- inkubáló puffer: 0,05 M TRIS, 0,15 M nátrium-klorid, 0,1 mM fenil-metil- szulfonil-fluorid, 0,05% Tween-20).

- 16 óra inkubálás humán antitestet tartalmazó mosóoldattal
- 3 x 10 perc mosás mosó- inkubáló pufferrel
- 1,5 óra inkubálás peroxidáz enzimmel jelzett anti-humán IgE ellenanyagot tartalmazó mosóoldattal
- 3 x 10 perc mosás mosó- inkubáló pufferrel
- 5 perc inkubálás hideg foszfát pufferben (135 mM nátrium-klorid, 2 mM kálium-klorid, 16 mM dinátrium-hidrogén-foszfát 2-hidrát, 2 mM kálium-dihidrogén-foszfát)
- előhívás: 4-kloro-naftollal hidrogén-peroxid jelenlétében (30 mg 4-kloro-naftol 10 ml etanolban oldva,+50 ml PBS oldat+200 µl 37% hidrogén-peroxid).

III. 2. 3. Marko tritikále proteomikai vizsgálata

III. 2. 3. 1. Tritikálefehérjék oldhatóság szerinti frakcionálása

Marko tritikále virágzás után 7., 14., 21. és 28. napon learatott mintáinak fehérjéit Osborne-szerinti frakcionálással szeparáltuk. A gabonaszemeket Hagberg-Perten darálón őrölték meg, 0,8 mm perforációs méretű szita használatával. A teljes őrleményeknek a szemcsemérete tehát ez alatti volt. A víz- és só-oldható frakciót (albumin-globulin) együtt nyertük ki. A frakciók fehérjetartalmát Bradford módszerrel mértük.

III. 2. 3. 2. Tritikálefehérjék szeparálása egydimenziós gélelektroforézissel

A minta előkészítése

Kettő mg liofilizált mintát 150- 250 µl mintaoldó pufferben (Mintaoldó puffer: 3% SDS; 62 mM TRISZ; 8,7% glicerin (87%); 10% β-merkaptó-etanol, pH: 6,8) oldottunk. Az oldatot 5 percig forraltuk, majd a gélre 3-15 µl előkészített mintát vittünk fel.

A vizsgálatokat Bio-Rad Mini-PROTEAN 3 Cell készüléken végeztük.

Elválasztó gél (12 %, 2 kis gélre):

30% akrilamid/ bis-akrilamid 29: 1 (Bio-Rad)	3,2 ml
2 M TRISZ-HCl (pH: 8,8)	1,8 ml
10% SDS	50 µl
Desztillált víz	2,85 ml

TEMED	6 µl
Ammónium-perszulfát (100 mg/ml)	50µl

A gél polimerizálódása után a tetejére gyűjtőgélzt öntöttünk, amibe elhelyeztük a mintafelvivő zsebek kialakításához szükséges fészűt.

Gyűjtőgél (6%, 2 kis gélre):

30% akrilamid/bis-akrilamid 29: 1 (Bio- Rad)	0,5 ml
10% SDS	27,5 µl
0,5 M TRISZ-HCl (pH: 6, 8)	0,33 ml
Desztillált víz	1,6 ml
TEMED	3 µl
Ammónium-perszulfát (100 mg/ml)	25 µl.

A mintafelvitelt követően a gélzt elektroforézis cellába helyeztük. Pufferrel történő feltöltés után a cellát áram alá helyeztük.

Elektroforézis puffer:

TRISZ	3,03 g
SDS	1,0 g
Glicin	14,4 g
1000 ml-re feltöltve desztillált vízzel.	

Elektroforézis paramétere:

feszűltség (konstans): 200 V
áramerősség (limit): 400 mA
futtatás ideje: 50-70 perc

Fehérjedetektálás

Az elválasztást követően Coomassie Blue R-250-el detektáltuk a fehérjéket azonos módon a III. 2. 2. 3. pontban ismertetekkel.

III. 2. 3. 3. Tritikáfehérjék biológiai aktivitásának vizsgálata

Az elektroforetikus blot és az immunreakció paraméterei megegyeznek a III. 2. 2. 5. pontban leírtakkal. Azzal a kiegészítéssel, hogy egydimenziós elválasztást követően a blottolási idő csak 60 perc.

A tritikáfehérjék IgE-kötő képességének kimutatásához klinikailag igazolt háttérű gabona-allergiás betegektől származó szérumot használtunk. Az immunreakciót peroxidáz enzimmel jelzett anti-humán IgE ellenanyag segítségével detektáltuk.

Az IgA-kötő képesség vizsgálatához klinikailag igazolt háttérű cöliákiás betegektől származó szérumot használtunk. Az antigén-antitest kialakulását peroxidáz enzimmel jelzett anti-humán IgA konjugátummal mutattuk ki.

A tritikáfehérjék búza gliadin antitesttel szembeni immunreakcióját nyúlban kifejlesztett anti-gliadin antitesttel és peroxidáz enzimmel jelzett anti-nyúl IgG ellenanyaggal követtük nyomon.

III. 2. 3. 4. Tritikáfehérjék szeparálása kétdimenziós gélelektroforézissel

A 2-DE vizsgálat menete megegyezik a III. 2. 2. 3. pontban ismertetekkel. Azzal a kiegészítéssel, hogy tritikáleminták esetében a fehérjéket első dimenzióban pH 3-10 tartományban fókuszáltuk és a 40 µg fehérjét vittünk fel a 7 cm-es stripekre.

III. 2. 3. 5. Fehérjeazonosítás MALDI-MS alkalmazásával

A vizsgált fehérjék in situ emésztése és tömegspektrometriás meghatározása III. 2. 2. 4. pontban leírtaknak megfelelően történt.

III. 2. 4. Árpa vonalak elektroforetikus vizsgálata

A vizsgált tavaszi árpafajták (Scarlett, Jubilant, Pasadena, Mandolina) kontroll mintáit csapadékellátás szempontjából optimális körülmények között termesztették Sopronhorpácson. A szárazság-stressz beállítása Táplánszentkereszten történt, egy speciális talaj előkészítés eredményeként, ezáltal a növények vízellátottsága nem volt optimális. Az árpaszemeket Hagberg-Perten darálón őrölték meg, 0,8 mm perforációs méretű szita használatával. A teljes őrleményeknek a szemcsemérete tehát ez alatti volt.

III. 2. 4. 1. Árpafehérjék extrakciója

A kioldható összes fehérje izolálását ún. lysis-pufferrel végeztük. Egy súlyrész törethez 10 térfogatnyi puffert adtunk (7 M karbamid, 2 M tiokarbamid, 4% CHAPS) és 30 percen át rázógépen rázatva extraháltuk. A kapott szuszpenziót 12 000 RPM-en, 20 percig centrifugáltuk. A felülúszót alikvotokra szedve -70°C-on tároltuk.

III. 2. 4. 2. Árpafehérjék szeparálása kétdimenziós gélelektroforézissel

A 2-DE vizsgálat menete megegyezik a III. 2. 2. 3. pontban ismertetekkel. Azzal a kiegészítéssel, hogy árpaminták esetében a fehérjéket első dimenzióban pH 3-11 tartományban fókuszáltuk és a 40 µg fehérjét vittünk fel a 7 cm-es stripekre.

III. 2. 5. Baktériumfehérjék proteomikai vizsgálata

III. 2. 5. 1. Baktériumfehérjék izolálása

A *Shewanella hanedei* baktériumot aerob körülmények között tenyésztettük Marine Broth agaron egy éjszakán át 16 °C-on, másnap a hőkezelt mintákat 37 °C-on 1 órán át inkubáltuk. A sejteket 4000 RPM-en 20 percig centrifugáltuk, ezután kétszer átmostuk 50mM Trisz (pH: 8,8) oldattal, amit minden esetben centrifugálás (4000 RPM, 20 perc) követett. A baktérium sejtek lízisét 8 M karbamidot, 40 mM Triszt, 4% CHAPS-ot és 0,05% DNase I-t tartalmazó oldattal végeztük, majd 13200 RPM-en 20 percig centrifugáltuk. A felülúszó fehérje-tartalmát Bradford módszerrel határoztuk meg.

III. 2. 5. 2. Oldható fehérjetartalom mérése

A vizsgált mintáink oldható fehérje-tartalmát Bradford (1976) leírása szerint határoztuk meg, ami egy egyszerű, festékkötődésen alapuló, fehérje-tartalom mérésre szolgáló módszer, melynek elve szerint a Coomassie Brilliant Blue G-250 festék savas oldatának abszorbancia maximuma fehérje jelenlétében (mennyiségtől függően) 465 nm-ről 595 nm-re változik.

III. 2. 5. 3. Kétdimenziós gélelektroforézis

Az első dimenzióban a baktérium fehérjéket izoelektromos pontjuk alapján szeparáltuk immobilizált pH gradienst tartalmazó stripen. A mintákat rehidratáló pufferben oldottuk (8 M karbamid, 0,05% CHAPS, 25 mM DTT), majd 200 µg fehérjét vittünk fel a 17 cm-es stripekre, passzív rehidratálást (7 óra) követően Multiphor II system (Pharmacia) készüléken a gyártó által előírt program szerint fókuszáltuk. A molekulatömeg szerinti poliakrilamid gélben történő elválasztás előtt a stripeket equilibráltuk 6 M karbamidot, 2% SDS-t és 30% glicerolt tartalmazó Trisz-HCl pufferben (pH=8,8) első lépésben 1% DTT jelenlétében 10 percig, majd 5% iodoacetamid jelenlétében szintén 10 percig. Második dimenzióban a fehérjéket 10% SDS-PAGE-n BIO-RAD PROTEAN II xi Cell készüléken szeparáltuk, 15 percig 20mA-en, majd 50mA-en.

Szeparáló gél (10%, 2 nagy gélre):

30% akrilamid/ bisz-akrilamid 29: 1 (Bio-Rad)	33,3 ml
1,5 M TRISZ-HCl (pH: 8,8)	25 ml
10% SDS	50 µl
Desztillált víz	40,2 ml
TEMED	33 µl
Ammónium-perszulfát (100 mg/ml)	500 µl

Fehérjedetektálás

- Coomassie Blue festéssel

A molekulatömeg szerinti elválasztás után a fehérjéket 20 percig fixáltuk 50% etanolt, 2% foszforsavat tartalmazó oldatban. Coomassie Blue R-250-el (34% metanol, 3,5% foszforsav, 0,2% Coomassie Blue R-250, 170g ammónium-szulfát) detektáltuk a fehérjéket. A gél 30 percig rázattuk a festékoldatban, majd 30% metanol oldattal távolítottuk el a háttérben maradt felesleges festéket.

- Ezüsfestéssel

Az elektroforézis befejezése után a szeparált fehérjéket 20 percig fixáltuk 50% metanol/ 5 % ecetsav oldatban, majd pedig 10 percig 50% metanolban. A maradék fixáló eltávolításához 10 percig rázattuk a géleket desztillált vízben. Ezután 1 percig redukáltuk a fehérjéket 0,02% nátrium-tioszulfáttal, majd 20 percig inkubáltuk 4 °C-on 0,2% ezüst-nitrát festékoldatban. Desztillált vizes mosást követően 2% nátrium-karnobátot, 0,05% formaldehidet (37%-os) és 0,0005% nátrium-tioszulfátot tartalmazó oldattal detektáltuk a fehérjéket. A reakciót 5% ecetsavval állítottuk le.

A gélképeket mindkét festési eljárást követően GS-800 denzitométer (BIO-RAD) készülékkel rögzítettük.

III. 2. 5. 4. Fehérjeazonosítás LC-MS/MS alkalmazásával

In situ emésztés

A gélből kivágott (manuálisan) mintákból első lépésben eltávolítottuk a Coomassie festéket, kétszer átmostuk 50 mM ammónium-bikarbonát/50% acetonitril oldattal (30 °C-on, 20 percig), majd levegőn szárítottuk. A fehérjék enzimikus hidrolíziséhez tripszint használtunk. A mintákhoz 100 ng tripszint tartalmazó 8 µl puffert (50 mM ammónium-bikarbonát) adtunk, elősegítve az enzim gélbe jutását, a mintákat jégen tároltuk 45 percig. A tripszines emésztést 37 °C-on végeztük egy éjszakán át további 50 mM ammónium-bikarbonát hozzáadását követően. A peptideket 60% acetonitril/1% hangyasav oldattal extraháltuk (30 °C-on, 3 percig), centrifugáltuk (13 200 RPM, néhány másodpercig) és fagyasztva szárítottuk.

LC-MS/MS

A proteolizátum fehérjemintáinak aminosav szekvenciáját LC/MS/MS technikával határoztuk meg. A mintákat 0,1% hangyasavban feloldva Ultimate Micro LC rendszeren (FAMOS automata mintaadagolóval) vizsgáltuk. A méréshez PEPMAP, 75 µm, 15 cm kolonnát ill. előkoncentrációhoz 800 µm, 2 mm kolonnát használtunk. Az eluálást lineáris gradiensen végeztük, az 5% acetonitril/0,1% hangyasav kiindulási koncentrációt 30 perc alatt 80% acetonitril/0,1% hangyasavra növelve, 100 nl/perc áramlási sebesség mellett. Az oszlopról eluált peptidek egy nanoelektrospray tűn keresztül jutottak a Q-TOF tömegspektrométerbe (Micromass). Az MS/MS spektrumokat manuálisan értékeltük, az eredményként kapott aminosav szekvenciából az NCBI (National Centre of Biotechnology Information) adatbázis Blast algoritmusával (www.ncbi.nlm.nih.gov ill. www.ebi.ac.uk) azonosítottuk a fehérjéket.

IV. CÉLKITŰZÉSEK

Munkám során proteomikai módszerek alkalmazásával a következő feladatokat végeztem el:

- Allergén búzafehérjék allergenitása és hidrofób jellege közötti összefüggés tanulmányozása 2-DE és MALDI-MS technika alkalmazásával. A köztermesztésbe vont kenyérgabona, a Hereward búza Osborne frakcióinak proteomikai tanulmányozása, és az albumin-globulin frakcióban megtalálható ismert búzaallergének jellemzése hidrofób jellegük szerint.
- Abiotikus (szárazság) stressz hatásának vizsgálata szülői és transzgénikus búza vonalak fehérjéinek összetételére és biológiai aktivitására. Stressz-indukált fehérjék kimutatása a szülői CY-45 és a transzgénikus T-117, T-106-3/a és T-128 búza vonalak tanulmányozásával.
- Különböző tavaszi árpa vonalak fehérje-összetételének vizsgálata és összehasonlítása azzal a céllal, hogy hogyan változnak szárazság-stressz hatására. A kísérletbe vont fajták (Scarlett, Jubilant, Pasadena, Mandolina) karbamid-oldható frakciójának fehérjetérképei szolgáltatják az összehasonlítás alapját.
- Egy tritikále (Marko) vonal fehérje-összetételének és biológiai aktivitás változásának nyomon követése az érési állapot függvényében, virágzás utáni 7., 14., 21. és 28. napon learatott gabonaszemek albumin-globulin frakciói alapján.
- 2-DE és LC-MS/MS technika alkalmazása hőstressz hatásának vizsgálata céljából, egy olyan organizmus (*Shewanella hanedei*) proteomikai tanulmányozására, amelynek genomja még nem feltérképezett.

V. EREDMÉNYEK ÉS KÖVETKEZTETÉSEK

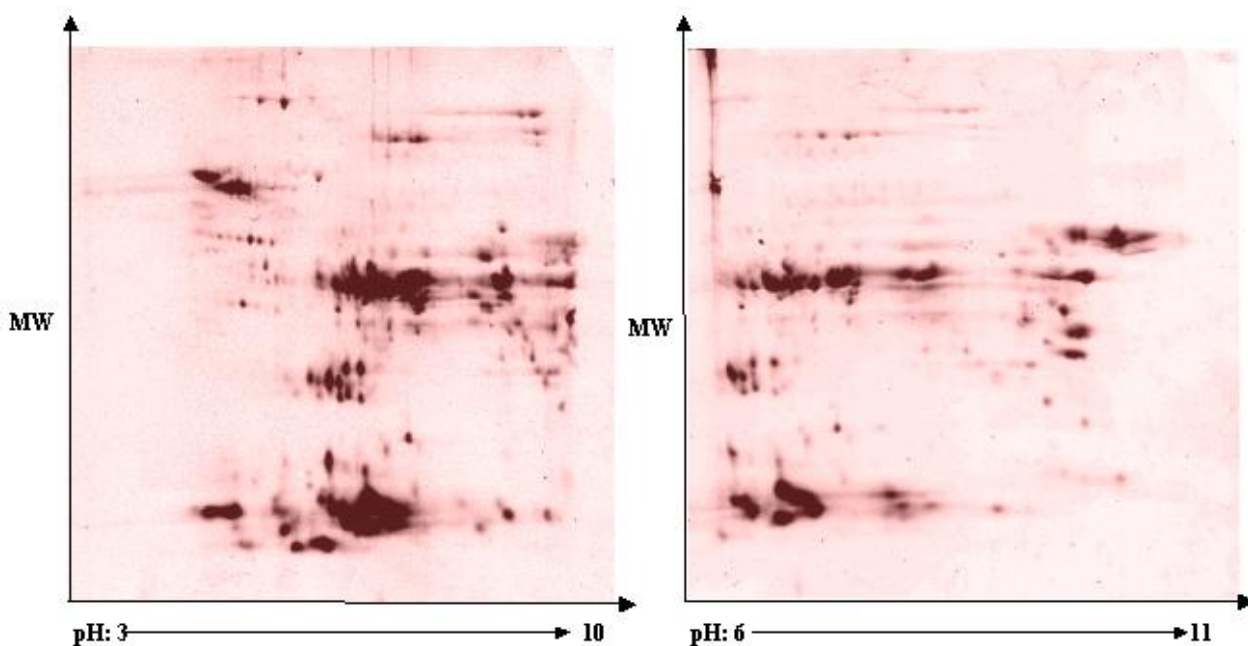
V. 1. Hereward búza kétdimenziós fehérje-térképének elkészítése és a fehérjék azonosítása

A genomika információt szolgáltat a szervezet genetikai állományáról, míg a proteomika a fehérje-összetételről: ahhoz hogy megértsük a növények genomja által meghatározott genetikai információkat, szükségünk van a génexpresszió eredményeként szintetizálódott fehérjék azonosítására. Ennek technikai feltétele egy olyan módszer, ami lehetővé teszi nagyszámú fehérje elválasztását és azonosítását egyidőben. Angliában az egyik legelterjedtebb köztermesztésbe vont kenyérgabona, a Hereward búza proteomikai vizsgálatát végeztük el.

A búzafehérjék frakcionálása oldhatóságuk alapján még ma is elterjedt módszer, az egyes frakciók azonban nem különíthetők el élesen, gyakori a fehérjék átoldódása a frakciók között. A vizsgált magas fehérjetartalmú Hereward őszi búzából Osborne szerinti frakcionálással előállított fehérjefrakciók további elválasztását kétdimenziós elektroforézissel, a fehérjék azonosítását pedig MALDI-MS technikával végeztük.

V. 1. 1. Kétdimenziós elektroforézis és MALDI-MS technika alkalmazása só- és vízőldható búzafehérjék elválasztására és azonosítására

Hereward búza albumin-globulin frakció fehérjéit első dimenzióban pH: 3-10 ill. 6-11 tartományban izoelektromos fókuszálással szeparáltuk, majd a második dimenzióban a mintákat 10%-os SDS-PAGE futtatással molekulatömegük szerint választottuk el. A kétdimenziós gélen a vizsgált frakcióból mintegy 200-250 fehérjét detektáltunk 7–90 kDa molekulatömeg és 3–10 izoelektromos pont tartományban (4/a. ábra). A bázikus tulajdonsággal rendelkező fehérjék izoelektromos fókuszálásához pH: 6-11 tartományú stripet használva az elválasztás felbontását jelentősen megnöveltük (4/b. ábra).



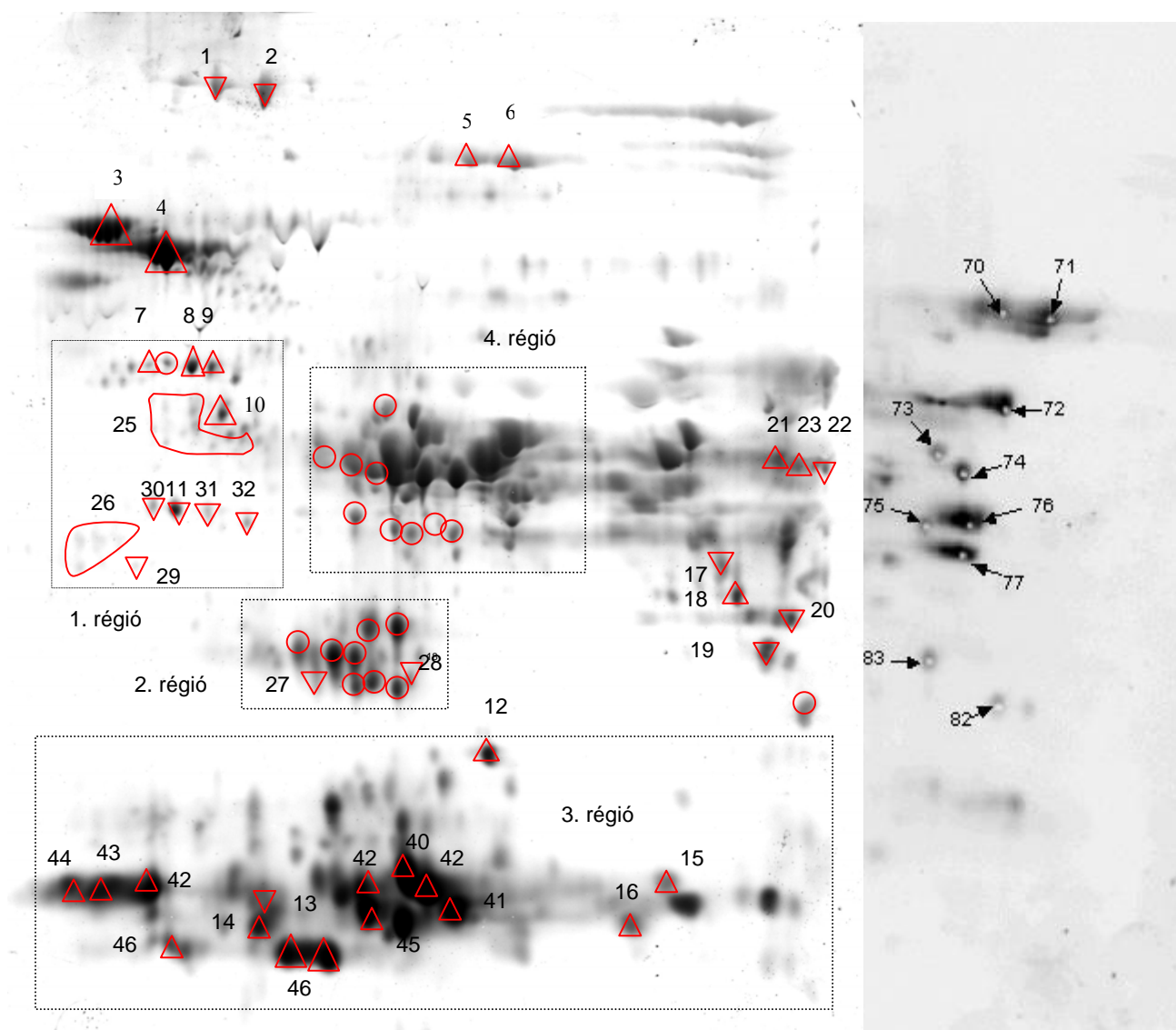
4. ábra

Hereward búza albumin-globulin frakció fehérjeinek kétdimenziós elektroforetikus elválasztási képe (pH: 3-10 és 10-120 kDa ill. pH: 6-11 és 10-120 kDa tartományban)

Sypro Ruby-festést követően a fehérje foltokat kivágtuk a gélből (5. ábra), majd tripszines emésztés után MALDI-MS technikával analizáltuk a fragmenseket. A fehérjéket az ún. „peptid ujjlenyomat (peptide mass fingerprint)” alapján Matrix Science adatbázis MASCOT programjával azonosítottuk.

Az 5. ábrán bemutatott fehérje-térképen az eredmények irodalmi adatokhoz való összehasonlíthatósága miatt 5 régiót jelöltünk meg:

1. régió: 30-45 kDa molekulatömeggel és savas (pH<5,5) izoelektromos ponttal rendelkező fehérjéket foglalja magába,
2. régió: 25-30 kDa molekulatömeggel és pH: 5-6 izoelektromos ponttal jellemezhető fehérjéket jelöli
3. régió: az alacsonyabb (<25 kDa) molekulatömegű polipeptidek tartománya
4. régió: 30-45 kDa molekulatömeggel és pH: 5-7 izoelektromos ponttal rendelkező fehérjéket foglalja magába
5. régió: bázikusabb (pH>8) izoelektromos ponttal jellemezhető polipeptideket jelöli.



5. ábra

Só- és vízdoldható búzafehérjék (Hereward) kétdimenziós fehérje-térképe (a 4/a. ábra alapján a pH: 3-10 és a 4/b. ábra alapján a pH>9 fehérjéket mutatja) és a MALDI-TOF MS módszerrel azonosított fehérjék jelölése

△: megbízható azonosítás, ▽: lehetséges azonosítás, O: sikertelen azonosítás.

Az elektroforetikus elválasztást követően összesen 83 fehérjefoltot analizáltunk. A Hereward búza albumin-globulin frakciójából meghatározott fehérjék MS adatait a 2. táblázatban foglaltuk össze.

2. táblázat: Hereward búza albumin-globulin frakciójából MALDI-TOF MS módszerrel azonosított fehérjék adatai

Folt száma	Azonosított fehérje	Azonosító szám (Swissprot/ Genebank)	Rendszertani név	Azonosító szám (EST)	% identity to accession	PMF MOWSE találat (95% szignifikancia szintnek megfelelő találat)	Kalkulált MW-pI	Folt jele (M.2. mellék letben)
1	HMW glutenin alegység DX5 prekuzora	P10388	<i>Triticum aestivum</i>			34	89,5-5,97	
2	HMW glutenin alegység DX5 prekuzora	<u>P10388</u>	<i>Triticum aestivum</i>			36	89,5-5,97	
3	β -amiláz (fragmens).	<u>Q7X9M2</u>	<i>Triticum aestivum</i>			86 (44)	31,1-8,6	A1
4	β -amiláz (Fragmens).	<u>Q7X9M2</u>	<i>Triticum aestivum</i>			101 (44)	31,1-8,6	A2
5	HMW glutenin alegység		<i>Triticum aestivum</i>	gi 6254838 3	67%		71,2-8,67	
6	HMW glutenin alegység		<i>Triticum aestivum</i>	gi 6254838 3	89%		71,2-8,67	
7	Szerpin	<u>P93692</u>	<i>Triticum aestivum</i>			106	42,9-5,44	
8	Szerpin	<u>P93692</u>	<i>Triticum aestivum</i>			125	42,9-5,44	
9	Szerpin	<u>P93692</u>	<i>Triticum aestivum</i>			203	42,9-5,44	
10	Szerpin	<u>P93692</u>	<i>Triticum aestivum</i>			139	42,9-5,44	
11	glioxaláz I	<u>Q9ZWI2</u>	<i>Oryza sativa</i>	<u>CN01305</u> <u>1</u>	92%	135 (78)	32,5	G6
12	endogén α - amiláz/szubtilizin inhibitor (WASI).	<u>P16347</u>	<i>Triticum aestivum</i>			152 (44) 134 (44) 179 (44) 215 (44) 137 (44) 132 (44)	19,8-6,77 19,8-6,77 19,8-6,77 19,8-6,77 19,8-6,77 19,8-6,77	D7 D8 D9 D10 D11 D12

Folt száma	Azonosított fehérje	Azonosító szám (Swissprot/ Genebank)	Rendszertani név	Azonosító szám (EST)	% identity to accession	PMF MOWSE találat (95% szignifikancia szintnek megfelelő találat)	Kalkulált MW-pI	Folt jele (M.2. mellék letben)
13	α -amiláz/tripszin inhibitor CM1 prekurzora	S10027	<i>Triticum aestivum</i>			41	16-7,49	
14	0,19 dimer α -amiláz inhibitor (fragment)	Q5UHH6	<i>Triticum aestivum</i>			76	138-5,73	
15	α -amiláz inhibitor 0,19	WIWTA1	<i>Triticum aestivum</i>			74	13,8-6,66	
16	0,19 dimer α -amiláz inhibitor (fragment)	Q5UHH6	<i>Triticum aestivum</i>			67	13,8-5,73	
17	szérpin	Q9ST57	<i>Triticum aestivum</i>			195	42,9-5,44	
18	xilanáz inhibitor I prekurzora	Q8L5C6	<i>Triticum aestivum</i>			200	33,4-8,66	
19	thaumatin-jellegű fehérje	Q8S4P7	<i>Triticum aestivum</i>			24	23,5-7,85	
20	kitináz	S04131	<i>Hordeum spontaneum</i>			47	33,4	
21	peroxidáz I	<u>Q05855</u>	<i>Triticum aestivum</i>			118	39,2-8,14	
22	NDP glükóz- keményítő glükozil transzferáz	<u>Q8LLD5</u>	<i>Triticum aestivum</i>			53	65,8-8,84	
23	peroxidáz I	<u>Q05855</u>	<i>Triticum aestivum</i>			74	39,2-8,14	
25	β -amiláz	P82993	<i>Hordeum spontaneum</i>	<u>CD894765</u> <u>CK207878</u> CD894765 CK207878 CK207878 CK207878 CD894765 CK207878 CD905964	90% 79% 90% 79% 79% 79% 90% 79% 89%	179 (78) 101 (78) 127 84 (78) 90 (78) 139 (78) 164 (78) 85 (78) 76 (78)	31,1-8,6	A3 A4 A5 A6 G11 A8 G1 G2 G3

Folt száma	Azonosított fehérje	Azonosító szám (Swissprot/ Genebank)	Rendszertani név	Azonosító szám (EST)	% identity to accession	PMF MOWSE találat (95% szignifikancia szintnek megfelelő találat)	Kalkulált MW-pI	Folt jele (M.2. mellék letben)
25	β-amiláz (Fragments).	<u>Q7X9M2</u>	<i>Triticum aestivum</i>			83 (44) 69 (44) 57	31,1-8,6	G9 G10 A9
26	β-amiláz	P82993	<i>Hordeum spontaneum</i>	CK207878	79%	139 (78)	31,1-8,6	A8
27	búza 27K fehérje	Q7Y1Z2	<i>Triticum aestivum</i>	CD906440	89%	122 (78)		E2
28	búza 27K fehérje (fragmens)	Q7Y1Z2	<i>Triticum aestivum</i>	BQ804422	92%	144 (78)		E12
29	kitináz II	Q8S870	<i>Oryza sativa</i>	BQ743303	73%	114 (78)		G4
30	glioxaláz I	<u>Q9ZWJ2</u>	<i>Oryza sativa</i>	CA643757 + BE490482	93%	164 (78) Mixture		G5
31	glioxaláz I	<u>Q9ZWJ2</u>	<i>Oryza sativa</i>	CA643757 + BE490482	93%	185 (78) Mixture		G7
32	glioxaláz I	<u>Q9ZWJ2</u>	<i>Oryza sativa</i>	<u>CA643757</u> ± <u>BE490482</u>	93%	185 (78) Mixture		G8
33	α-amiláz inhibitor	Q5UHH6	<i>Triticum aestivum</i>	BJ238252	100%	86 (78)		F1
34	0,19	<u>P01085</u>				92 (44)	13,9-6,66	F6
36		<u>P01085</u>				80 (44)	13,9-6,66	F9
37		<u>P01085</u>				100 (44)	13,9-6,66	F11
38		<u>P01085</u> Q5UHH6		BJ238252	100%	79 (44) 87 (78)	13,9-6,66	F8 F10
39	ubikvitin	Q41570	<i>Triticum aestivum</i>			77 (44)	8,6-6,56	E10
40	α-amiláz /tripszin inhibitor CM3 prekurzora	<u>P17314</u> <u>P17314</u> <u>P17314</u> <u>P17314</u>	<i>Triticum aestivum</i>			74 (44) 74 (44) 52 (44) 92 (44)	18,9-7,44 18,9-7,44 18,9-7,44 18,9-7,44	F4 F9 F10 H10

Folt száma	Azonosított fehérje	Azonosító szám (Swissprot/ Genebank)	Rendszertani név	Azonosító szám (EST)	% identity to accession	PMF MOWSE találat (95% szignifikancia szintnek megfelelő találat)	Kalkulált MW-pI	Folt jele (M.2. mellék letben)
41	α -amiláz /tripszin inhibitor CM1 prekurzora	<u>P16850</u> <u>P16850</u>	<i>Triticum aestivum</i>			47 (44) 73 (44)	13,85-6,72 16,1-7,49	E6 H12
42	α -amiláz inhibitor 0,53	<u>P01084</u>	<i>Triticum aestivum</i>	-		103 (44)	13,7-5,23	G9
43	α -amiláz /tripszin inhibitor CM16 prekurzora	<u>P16159</u>	<i>Triticum aestivum</i>			70 (44)	16,4-5,31	H1
44	CM 17 fehérje	<u>Q41540</u> <u>Q41540</u>	<i>Triticum aestivum</i>			61 (44) 50 (44)	16,5-5,07 16,5-5,07	H2 H5
45	α -amiláz /tripszin inhibitor CM2 prekurzora	<u>P16851</u>	<i>Triticum aestivum</i>			74 (44)	16,0-6,86	H8
46	α -amiláz inhibitor 0,28 (CIII) (WMAI- 1).	<u>P01083</u>	<i>Triticum aestivum</i>			96 (44)	13,9-6,18	H6
76	tritin	<u>S33631</u>	<i>Triticum aestivum</i>			128	29,5-9,7	
77	tritin	<u>S33631</u>	<i>Triticum aestivum</i>			95	29,5-9,7	

Az azonosított fehérjéket funkciójuk alapján védő-, metabolikus-, antioxidáns- és egyéb fehérjék csoportjába soroltuk (Vensel és mtsai., 2005; Salt és mtsai., 2005).

Védőfehérjék

Az azonosított fehérjék egy csoportja a patogének enzimeinek működését gátolva fejti ki hatását, ide tartoznak a tripszin/ α -amiláz inhibitor család tagjai, pl.: a 0,19 (14, 15, 16, 33, 34, 36, 37, 38), a 0,28 (46) és a 0,53 (42) α -amiláz inhibitor, az α -amiláz / tripszin inhibitor CM1 (13, 41), CM2 (45), CM3 (40), CM16 (43) és CM17 (44) prekurzora, az endogén α -amiláz / szubtilizin inhibitor (12). Szerin proteáz inhibitor (szerpint) mutattunk ki pI: 5,18-nál és MW: 43 kDa-nál a 7, 8 és 9 jelzésű fehérje foltokban, irodalmi adatok alapján ezen inhibitorok a tartalék fehérjék érés

előtti proteolízisét gátolják (Ostergaard és mtsai., 2000). A védőfehérjék egy másik csoportja a thaumatin-jellegű fehérjék (19), hatásukat nem enzim működés gátlásán keresztül fejtik ki, hanem a patogének membránjának permeabilitását módosítják, azokat átjárhatóvá teszik. A 29 jelzéssel ellátott fehérjét kitináz enzimeként azonosítottuk, amely a patogén gombák sejtfalalkotó szénhidrátját hidrolizálva biztosít védelmet a növény számára. Szintén a gombák elleni védekezésben vesz részt a bázikus karakterű fehérjék között kimutatott xilanáz inhibitor (18), amely glikohidrolázok működését gátolja. Az azonosított fehérjék közül legbázikusabb a tritin (76, 77), amely egy RNA N-glikozidázként gátolja a fehérje szintézist a riboszómákban.

Metabolikus fehérjék

A szénhidrát metabolizmusban résztvevő azonosított enzimek közül a β -amiláz (3, 4, 25, 26) fordul elő a legnagyobb mennyiségben a vizsgált búzamintában. A Matrix Science adatbázis által megadott molekulatömeg (31 kDa) jelentős eltérést mutat az általunk elválasztott fehérje gélen észlelt tömegéhez (kb. 55 kDa) képest. Az adatbázisban a vizsgálat időpontjában csak a búza β -amiláz enzimjének fragmense szerepelt. Salt és mtsai. (2005) a búza térszta oldható-fehérjéiben kimutatott β -amilázt (MW: 58,7 kDa és pI:5,10) az adatbázisban található, árpából származó enzim peptidtömege alapján azonosították. A meghatározott polipeptidek közül szintén a szénhidrát anyagcserében vesz részt a fruktóz-bifoszfátáz, illetve a keményítő bioszintézisben szerepet játszó NDP glükóz-keményítő glükozil transzferáz (22).

Antioxidáns fehérjék

Az oldható fehérje-frakcióban kimutatott enzimek egy csoportja antioxidáns hatással rendelkezik. Az antioxidáns enzimek az oxidatív stresszt megelőző és kivédő rendszer fontos elemei. A reaktív komponensek eltávolításával a detoxifikáló folyamatokban játszanak szerepet. A növényi szervezetekben igen elterjedt oxidoreduktáz enzimet a peroxidázt, amely a búzában is megtalálható, a 7. ábrán 21-23 jelzéssel ellátott fehérjefoltokban azonosítottuk. A glioxaláz I (30, 31, 32) enzim funkciója magasabbrendű növényekben még nem teljesen tisztázott, feltehetőleg a metil-glioxál detoxifikálását végzi (Espartero és mtsai., 1995).

Egyéb fehérjék

Az ubikvitin (39) rendszer felelős számos denaturált vagy hibás, ill. regulátor fehérje lebontásáért. Az ATP-függő intracelluláris proteolízisben részt vevő ubikvitint hősokk fehérjének tartják (Szigeti, 2002). Irodalmi adatok alapján allergén tulajdonságú fehérjét, 27K proteint a 27 és 28 jelzéssel ellátott fehérje foltokban mutattunk ki.

Eredményeinket Salt és mtsai. (2005) adatai alapján értékeltük. Irodalmi adatok alapján a búzalisztból tésztakészítéshez leggyakrabban használt összetevőket (nátrium-klorid, nátrium-aszkorbát) tartalmazó vizes oldattal legnagyobb mennyiségben extrahált fehérjék a β -amiláz, a tritin, és a szerpin ill. a tripszin/ α -amiláz inhibitor család tagjai.. A prolamin szupercsalád 4 tagját azonosítottuk az albumin-globulin frakcióban, két HMW glutenin alegységet és két HMW glutenin alegység DX5 prekuzort, a tésztakészítés után végzett extrakció esetében nem tapasztaltak átoldódást. A szénhidrát metabolizmusban résztvevő β -amiláz mind az albumin-globulin frakcióban, mind a tészta oldható fehérjeiben nagy mennyiségben fordult elő.

Az 1. régióban Salt és mtsai. (2005) eredményeivel összevetve kisebb intenzitású, de hasonló fehérjéket detektáltunk (5. ábra alapján). Az azonosított kitináz II enzim nem felel meg a tészta oldható fehérjeiből meghatározott kitináz III-nak, az enzim előfordulása a búzában tehát heterogenitást mutat. A védőfehérjék egy másik csoportjának tagját, a szerpint szintén kisebb mennyiségben mutattuk ki a búzaliszt albumin-globulin frakciójában.

A 2. régióban detektált fehérjék intenzitásban és összetételben is eltérést mutatnak az irodalmi adatokhoz képest (Salt és mtsai., 2005). Az allergén tulajdonsággal rendelkező 27K fehérjét mindkét fehérje-térkép tartalmazta.

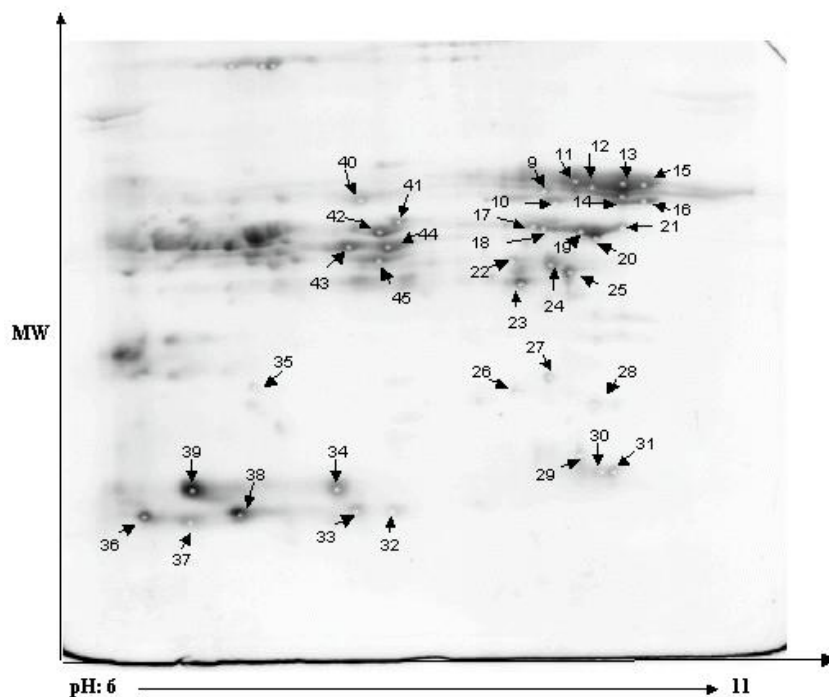
A két fehérje-térkép alacsonyabb molekulatömeggel jellemezhető 3. régiójának domináns polipeptidjei az egyfejű ill. a bifunkcionális tripszin/ α -amiláz inhibitorok (0,19, 0,28 és 0,53 α -amiláz inhibitor, α -amiláz / tripszin inhibitor CM1, CM2, CM3, CM16 és CM17 prekuzora, ill. endogén α -amiláz / szubtilizin inhibitor).

A 4. régió hasonló fehérje-mintázata nagyobb intenzitást mutat a búzaliszt albumin-globulin frakciójában.

A bázikusabb tulajdonsággal rendelkező (pH>8) fehérjék (5. régió): a peroxidáz, a thaumatin-jellegű, a XIP 1 és a kitináz C mindkét mintában kimutathatók.

V. 1. 2. Kétdimenziós elektroforézis és MALDI-MS technika alkalmazása alkohol-oldható búzafehérjék fehérje-térképének elkészítésére

Hereward búza gliadin frakció fehérjéit első dimenzióban 6-11 tartományban izoelektromos fókuszálással szeparáltuk, majd a második dimenzióban a mintákat 10%-os SDS-PAGE futtatással molekulatömegük szerint választottuk el (6. ábra).



6. ábra

Alkohol-oldható búzafehérjék (Hereward) kétdimenziós fehérje-térképe (a MALDI-TOF MS módszerrel azonosított fehérjéket jelöltük)

Detektálás után a fehérje foltokat kivágtuk a gélből, majd tripszines emésztést követően felvett peptidtérképek és –tömegek alapján a Matrix Science adatbázis MASCOT programjával azonosítottuk a polipeptideket.

A Hereward búza gliadin frakciójából meghatározott fehérjék MS adatait a 3. táblázatban foglaltuk össze.

3. táblázat: Hereward búza gliadin frakciójából MALDI-TOF MS módszerrel azonosított fehérjék adatai

Folt száma	Azonosított fehérje	Rendszertani név	PMF MOWSE találat	Kalkulált MW-pI
10	LMW glutenin (fragmens)	<i>Triticum aestivum</i>	36	30678-8,57
16	LMW glutenin alegység prekursora	<i>Triticum aestivum</i>	48	41451-9,04
17	LMW glutenin alegység	<i>Triticum aestivum</i>	38	34948-8,90
21	LMW glutenin alegység	<i>Triticum aestivum</i>	30	34948-8,90
29	Oleoin 1	<i>Hordeum spontaneum</i>	78	18483-9,69
32	WCI proteináz inhibitor	<i>Triticum aestivum</i>	46	13506-7,42
34	α -amiláz/tripszin inhibitor CM3 prekursora	<i>Triticum aestivum</i>	83	18893-7,44
36	α -amiláz/tripszin inhibitor CM2 prekursora	<i>Triticum aestivum</i>	53	16020-6,86
38	α -amiláz/tripszin inhibitor CM3 prekursora	<i>Triticum aestivum</i>	96	16077-7,49
39	α -amiláz/tripszin inhibitor CM3 prekursora	<i>Triticum aestivum</i>	69	18893-7,44

Az MS eredmények alapján az analizált 45 fehérjéből csak 10 polipeptidet tudunk azonosítani az alkohol-oldható frakcióban. Alacsony molekulatömegű glutenin alegységeket, árpa oleosin 1 fehérjével homológiát mutató fehérjét, WCI proteináz inhibitor és az α -amiláz/tripszin inhibitor CM2, illetve CM3 prekursorát határoztunk meg.

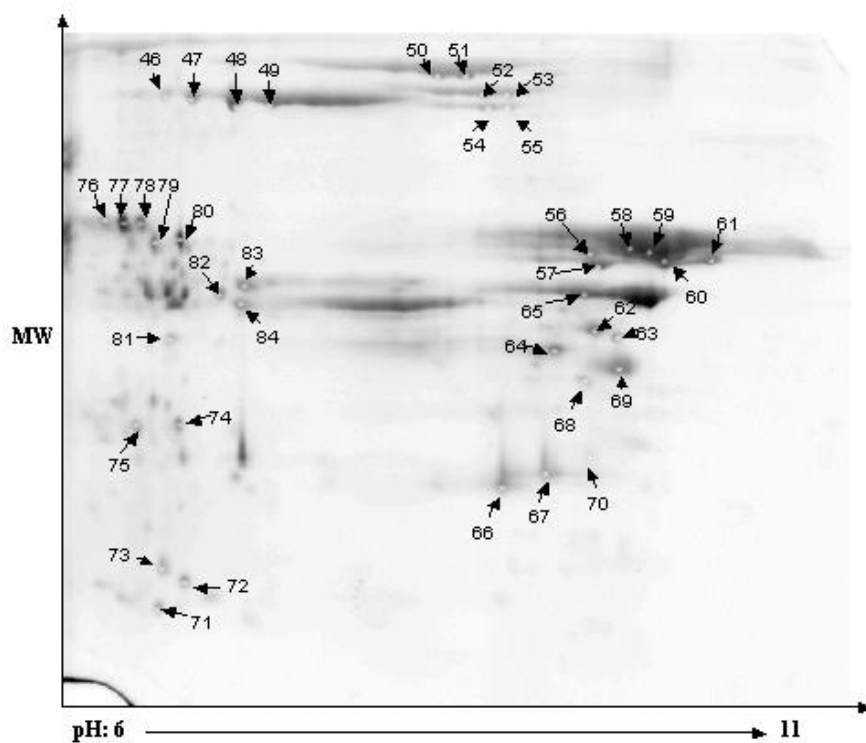
Az oleosin 1 fehérjetartalmú komponense a növények lipidraktározó részecskéinek az un. olajtestecskének (Pons és mtsai., 2002). Az olajtestecskék egyszerű sejtalkotók, foszfolipid réteggel körülvett triacil-glicerinnél épülnek fel, amit egy fehérje, az oleosin borít. Fontos szerepet töltenek be a lipid-akkumulációban.

Az α -amiláz/tripszin inhibitorok kloroform/ metanol-oldható prekursorai a legújabb irodalmi eredmények alapján a BSA-hoz hasonló felületaktivitással rendelkeznek, ezzel emulgeátorként történő felhasználásuk (Gilbert és mtsai., 2003) lehetséges.

A búza alkohol-oldható fehérjék elektroforetogramja és a fehérjeazonosítás eredményei alapján megállapítottuk, hogy a gliadin és az LMW glutenin alegységek átfedéseket mutatnak.

V. 1. 3. Kétdimenziós elektroforézis és MALDI-MS technika alkalmazása a sav-oldható búzafehérjék fehérje-térképének elkészítésére

Hereward búza albumin-globulin, illetve prolamin fehérjéinek vizsgálatát követően a sav-oldható fehérjék fehérje-térképét is elkészítettük. Első dimenzióban pH: 6-11 izoelektromos pont, második dimenzióban pedig 10-100 kDa molekulatömeg tartományban végeztük az elválasztást (7. ábra). Az elektroforetogramon jelzett fehérjéket analizáltuk MALDI-MS technikával (4. táblázat).



7. ábra

Sav-oldható búzafehérjék (Hereward) kétdimenziós fehérje-térképe és a MALDI-TOF MS módszerrel azonosított fehérjék jelölése

4. táblázat: Hereward búza glutenin frakciójából MALDI-TOF MS módszerrel azonosított fehérjék adatai

Folt száma	Azonosított fehérje	Rendszertani név	PMF MOWSE találat	Kalkulált MW-pI
46	HMW glutenin alegység 12 prekurzora	<i>Triticum aestivum</i>	48	71224-7,64
47	HMW glutenin alegység 12 prekurzora	<i>Triticum aestivum</i>	101	71224-7,64
48	HMW glutenin alegység 12 prekurzora	<i>Triticum aestivum</i>	74	71224-7,64
52	HMW glutenin 1By9 prekurzora	<i>Triticum aestivum</i>	91	76055-7,64
53	HMW glutenin 1By9 prekurzora	<i>Triticum aestivum</i>	85	76055-7,64
54	HMW glutenin 1By9 prekurzora	<i>Triticum aestivum</i>	87	76055-7,64
55	HMW glutenin 1By9 prekurzora	<i>Triticum aestivum</i>	72	76055-7,64
57	LMW glutenin alegység 2.csoport I.típusa	<i>Triticum aestivum</i>	52	39445-8,69
61	LMW glutenin alegység prekurzora	<i>Triticum aestivum</i>	38	41451-9,04
65	peroxidáz 1	<i>Triticum aestivum</i>	89	39255-8,14
69	tritin	<i>Triticum aestivum</i>	65	29594-9,70
72	α -amiláz inhibitor 0,19	<i>Triticum aestivum</i>	97	13899-6,66
73	HMW glutenin alegység	<i>Triticum aestivum</i>	67	20193-8,85
76	triticin prekurzor	<i>Triticum aestivum</i>	122	57318-9,37
77	triticin prekurzor	<i>Triticum aestivum</i>	133	57318-9,37
78	triticin prekurzor	<i>Triticum aestivum</i>	179	57318-9,37
79	triticin prekurzor	<i>Triticum aestivum</i>	94	57318-9,37
80	triticin prekurzor	<i>Triticum aestivum</i>	83	57318-9,37

A peptidtömegek ismerete alapján 18 fehérje azonosítását tudtuk elvégezni nemzetközi adatbázisok segítségével. Számos HMW és egy LMW glutenin alegység, ill. annak prekurzora mellett peroxidáz 1 enzimet, 0,19 α -amiláz inhibitor és triticin prekurzort sikerült meghatároznunk.

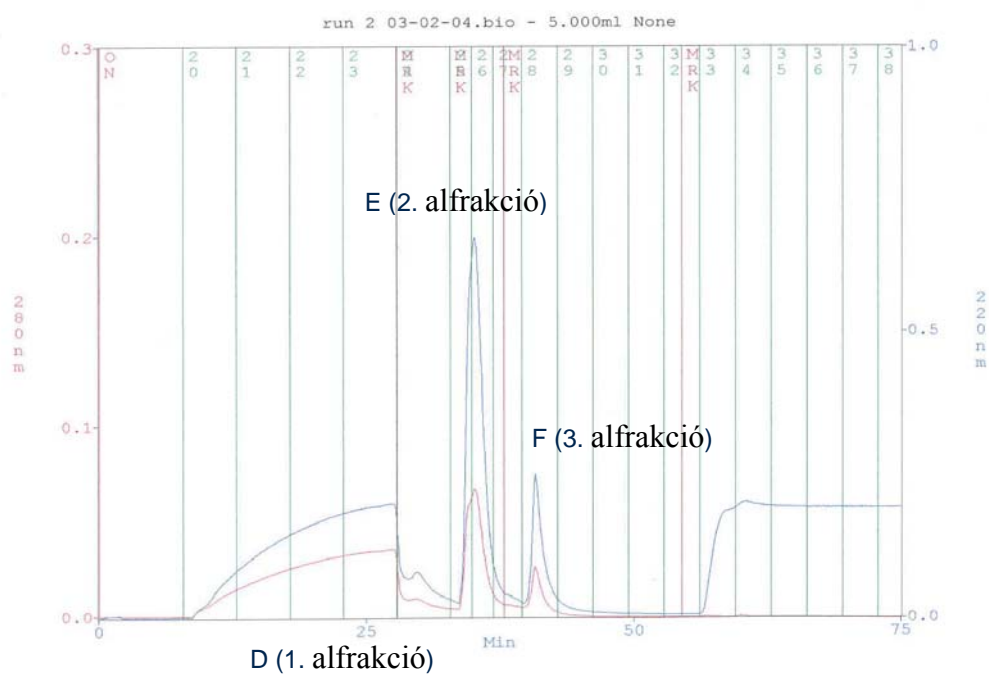
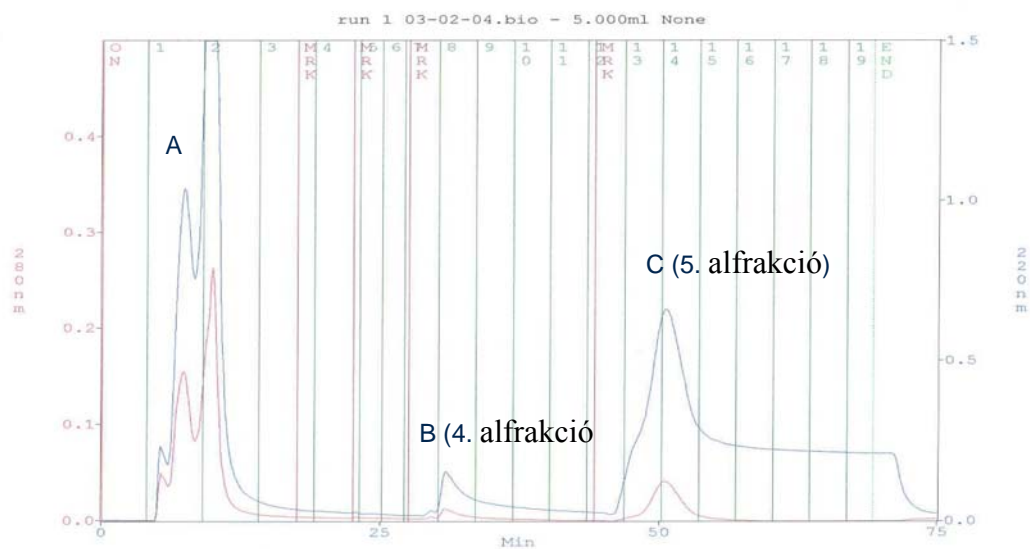
Irodalmi adatok szerint a redukált glutenin frakció 17-20 alegységre bontható, melyek molekulatömege 12000-134000 Da közé esik (Lásztity, 1999). Az azonosított fehérjék közül a HMW glutenin 1By9 prekuzora rendelkezik a legmagasabb molekulatömeggel, 76 kDa. Az endosperm minor tartalékfehérjéje a triticin, kiemelkedően magas lizintartalma miatt egyike a génmódosítás (Shailaja és mtsai., 2002) célmolekuláinak.

V. 2. Búzafehérjék allergén jellege és hidrofób tulajdonsága közötti összefüggés feltérképezése

Az ismert élelmiszer allergének többsége, 10-70 kDa molekulatömegű, általában összetett fehérje, amely a tápcsatorna enzimekkel szemben ellenálló továbbá a technológiai kezelések során stabilan megtartja szerkezetét. Munkánk során az ismert allergéneket (Sander és mtsai., 2001) tartalmazó albumin-globulin frakció fehérjéit hidrofób kölcsönhatási kromatográfiával szeparáltuk. Hipotézisünk alapján a hidrofób tulajdonsággal rendelkező fehérjék képesek az élelmiszerek lipid részéhez kapcsolódni, ezáltal ellenállnak a hasítási folyamatoknak, azaz rezisztensek a tápcsatorna enzimeivel szemben.

V. 2. 1. Albumin-globulin búzafehérjék elválasztása hidrofób tulajdonság alapján

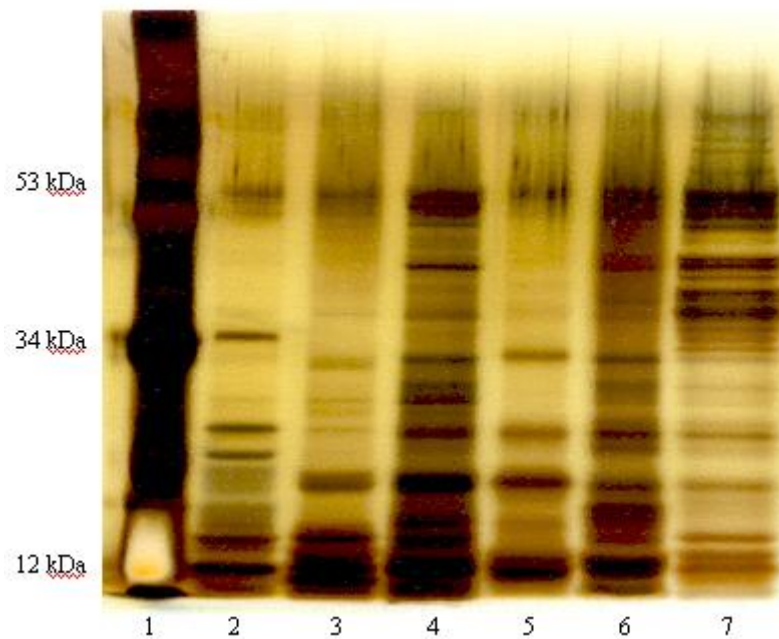
A búza albumin-globulin frakciójának fehérjéit hidrofób kölcsönhatási kromatográfiával (HIC) Octyl Sepharose oszlopon 2 lépésben szeparáltuk. Az első lépésben karbamiddal eluáltuk a leginkább hidrofób (5. alfrakció) ill. etilén glikollal a közepesen hidrofób (4. alfrakció) fehérjéket. Az első lépésben vízzel eluált hidrofil (A) jelleget mutató fehérjéket ammónium-szulfát hozzáadása után a második lépésben hidrofil (1. alfrakció), közepesen hidrofil (2. alfrakció) és kismértékben hidrofób (3. alfrakció) alfrakciókra szeparáltuk (8. ábra).



8. ábra

Só- és vízzoldható búzafehérjék (Hereward) elválasztása hidrofób kölcsönhatási kromatográfiával 2 lépésben HiTrap Octyl Sepharose oszlopon. A, E: víz; B, F: etilén glikol (50%; v/v); C: karbamid (7 M); D: ammónium-szulfát (1,2 M).

Az alfrakciók fehérjeit 10 és 100 kDa közötti molekulatömeg tartományban elválasztva vizsgáltuk (9. ábra).



9. ábra

Só- és vízzoldható búzafehérjék (Hereward) és HIC technikával szeparált alfrakcióik SDS-PAGE képe (1: molekulatömeg standard, 2: hidrófil 1. alfrakció, 3: közepesen hidrófil 2. alfrakció, 4: kismértékben hidrófób 3. alfrakció, 5: közepesen hidrófób 4. alfrakció, 6: hidrófób 5. alfrakció, 7: kiindulási albumin-globulin frakció).

Az alfrakciók fehérje-mintázatában eltérő intenzitású, de hasonló fehérjesávokat detektáltunk a 20 kDa alatti molekulatömeg tartományban. Jellegzetes eltéréseket az alfrakciók fehérjetérképe a 25-50 kDa tartományban mutatott. Az 53 kDa molekulatömegnél észlelt fehérjesávban szintén intenzitásbeli eltérést tapasztaltunk.

V. 2. 2. Kétdimenziós elektroforézis és MALDI-MS technika alkalmazása különböző hidrofób tulajdonságú albumin-globulin búzafehérjék azonosítására

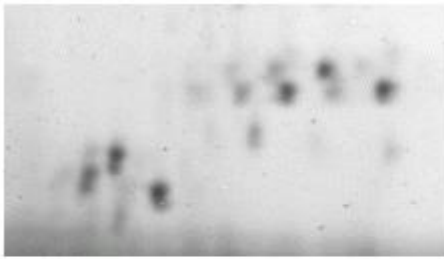
A HIC elválasztás után kapott 5 alfrakciót kétdimenziós gélelektroforézissel tovább vizsgáltuk: első dimenzióban pH: 3-10 tartományban izoelektromos fókuszálással, majd a második dimenzióban a mintákat 10%-os SDS-PAGE futtatással molekulatömegük szerint választottuk el. Az elektroforetikus elválasztást követően a fehérje foltokat kivágtuk a gélből (ProPick Spot Picker robottal), majd tripszines emésztés (Investigator ProGest robottal) után Maldi-MS technikával adatbázis alapján azonosítottuk a peptideket.

A különböző alfrakciók fehérje-térképeit az V. 1. 1. fejezetben ismertetett alábbi régiók alapján hasonlítottuk össze (10. ábra):

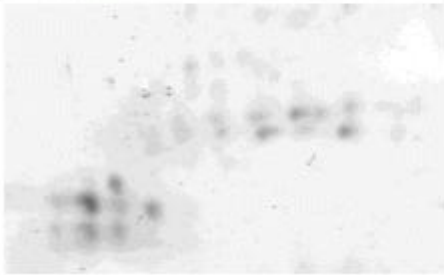
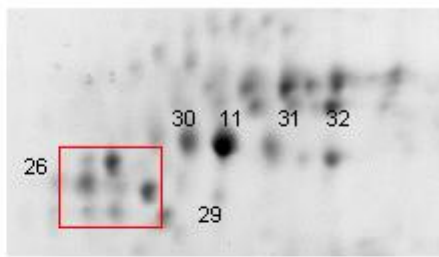
1. régió: 30-45 kDa molekulatömeggel és savas ($\text{pH} < 5,5$) izoelektromos ponttal rendelkező fehérjéket foglalja magába,
2. régió: 25-30 kDa molekulatömeggel és pH : 5-6 izoelektromos ponttal jellemezhető fehérjéket jelöli
3. régió: az alacsonyabb (<25 kDa) molekulatömegű polipeptidek tartománya
4. régió: 30-45 kDa molekulatömeggel és pH : 5-7 izoelektromos ponttal rendelkező fehérjéket foglalja magába
5. régió: bázikusabb ($\text{pH} > 8$) izoelektromos ponttal jellemezhető polipeptideket jelöli.

1. régió

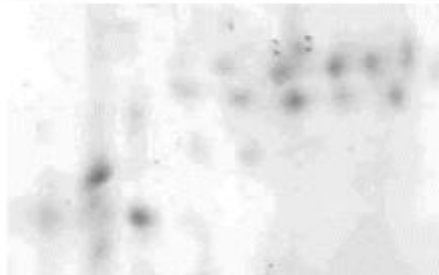
1. alfrakció



2. alfrakció



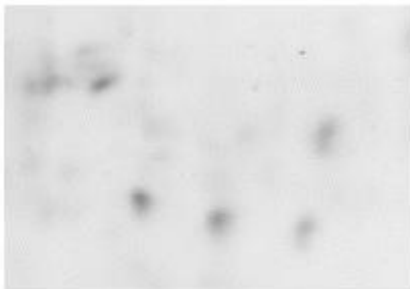
3. alfrakció



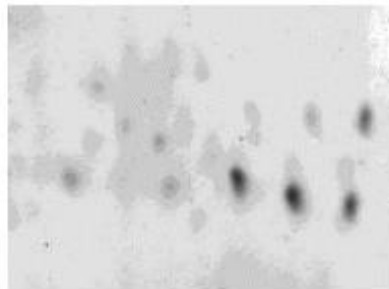
5. alfrakció

2. régió

2. alfrakció



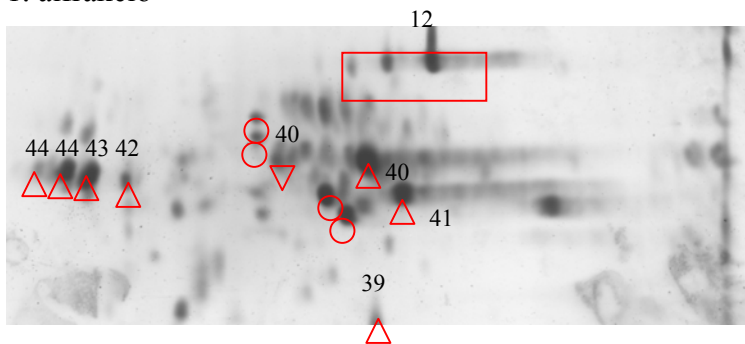
3. alfrakció



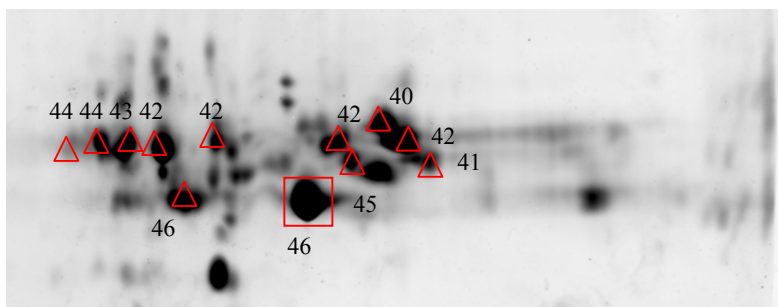
5. alfrakció

3. régió

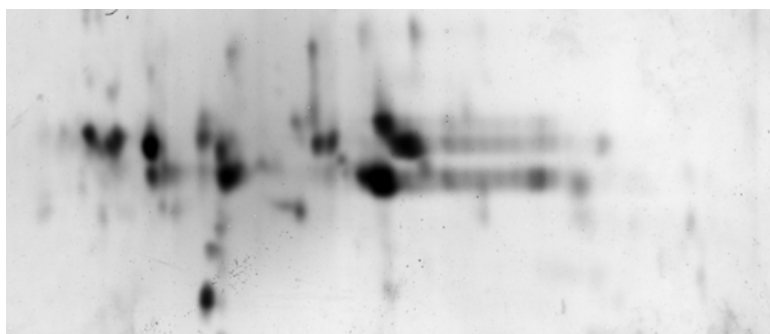
1. alfrakció



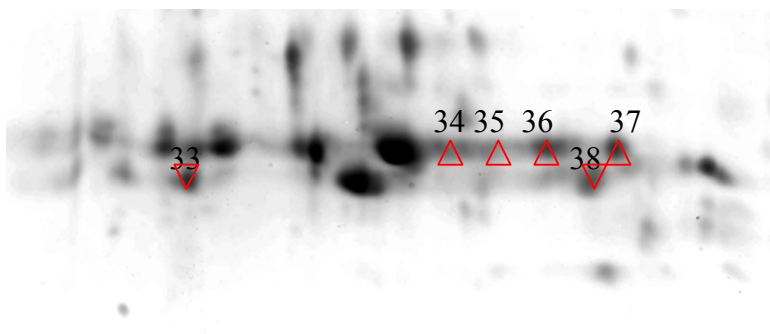
2. alfrakció



3. alfrakció



5. alfrakció



10. ábra

Albumin-globulin búzafehérjéből (Hereward) HIC elválasztással kapott alfrakciók 2-DE képe -az 5. ábrán megjelölt régiók alapján- és a MALDI-TOF MS módszerrel azonosított fehérjék jelölése

Az 1. régióban észlelt szerpint, ill. a rizs glioxaláz I enzimjével homológiát mutató 10 jelzéssel ellátott fehérjét az 1. és a 2. alfrakcióban extraháltuk a legnagyobb mennyiségben. A 2. régióban detektált fehérjék a leginkább hidrofób polipeptideket tartalmazó 5. alfrakcióban jelentek meg. Az alacsonyabb molekulatömeggel jellemezhető 3. régió fehérjéit a különböző hidrofób karaktert mutató alfrakciók mindegyikében extraháltuk, eltérő mintázattal és intenzitással. A 0,28 α -amiláz inhibitor a 2. alfrakcióban a legintenzívebb, az α -amiláz/tripszin inhibitor CM1 prekursora szintén hidrofíl tulajdonsággal jellemezhető, a 4. és az 5. alfrakcióban már nem mutatható ki. Hidrofíl jelleget mutat az 1. alfrakcióban 39 jelzéssel ellátott ubikvitin is.

Eredményeink szerint az albumin-globulin búzafehérjék HIC elválasztása után kapott alfrakciók fehérje-térképe eltérő mintázatot és intenzitásbeli különbségeket mutat. Az Octyl-Sepharose-n való elválasztás alapján hidrofób tulajdonsággal jellemezhetjük pl: a 0,19 és 0,53 α -amiláz inhibitort, az ismert allergént, a 27K fehérjét ill. a 4. régióban extrahált, irodalmi adatok szerint 3-foszfát-dehidrogenáz enzimet. A szerpin, a glioxaláz I, a 0,28 α -amiláz inhibitor és az ubikvitin a HIC elválasztás alapján inkább hidrofíl jelleget mutató polipeptidek. Az általunk alkalmazott HIC alapján azonban nem tudtuk egyértelműen definiálni számos fehérje hidrofób jellegét.

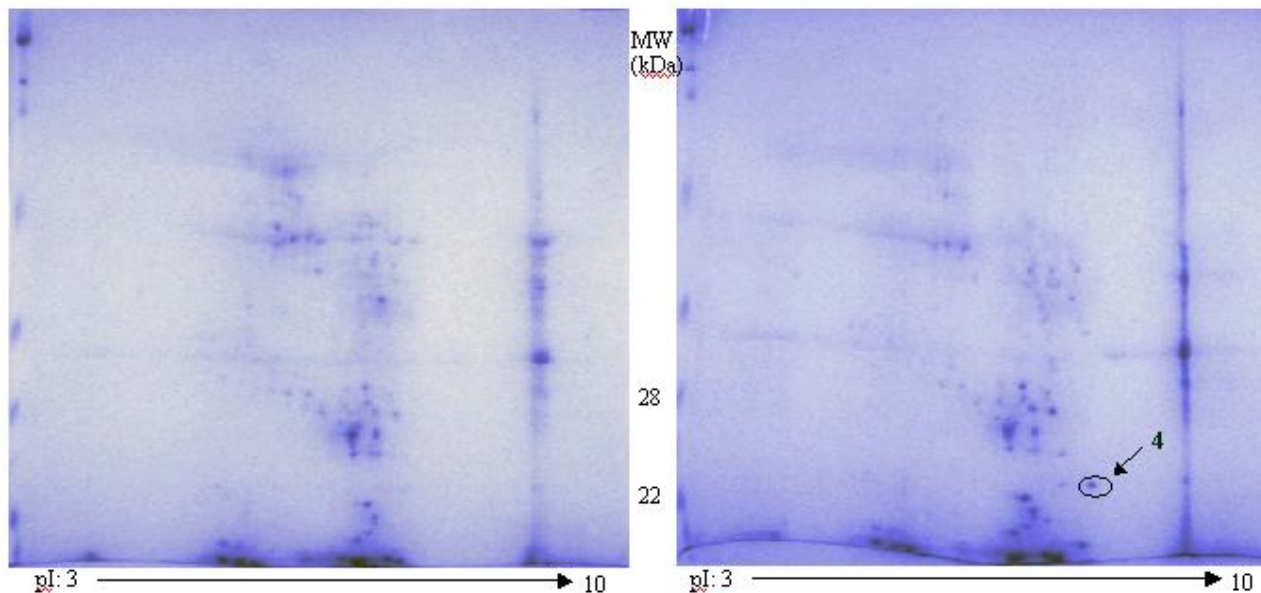
Az élelmiszerfehérjék allergén aktivitásának megállapítása, előrejelzése érdekében a már ismert allergének közös fiziko-kémiai tulajdonságainak megismerésére és azon szerkezeti sajátosságok értelmezésére, melyeket az IgE antitestek felismernek, már eddig is sok erőfeszítés történt. Vizsgálataink alapján a búzafehérjék allergén jellege és azok hidrofób tulajdonsága között nem tapasztaltunk egyértelmű és szoros összefüggést, tehát az élelmiszerfehérjék allergén jellegét nem determinálhatjuk kizárólag hidrofób tulajdonságuk alapján.

V. 3. Környezeti változás hatásainak nyomon követése szülői és transzgénikus búza vonalak fehérje-összetételében kétdimenziós elektroforézis és MALDI-MS technika alkalmazásával

V. 3. 1. Szárazság-stressz hatásának vizsgálata szülői és transzgénikus búza vonalak albumin-globulin fehérjéinek mintázatára

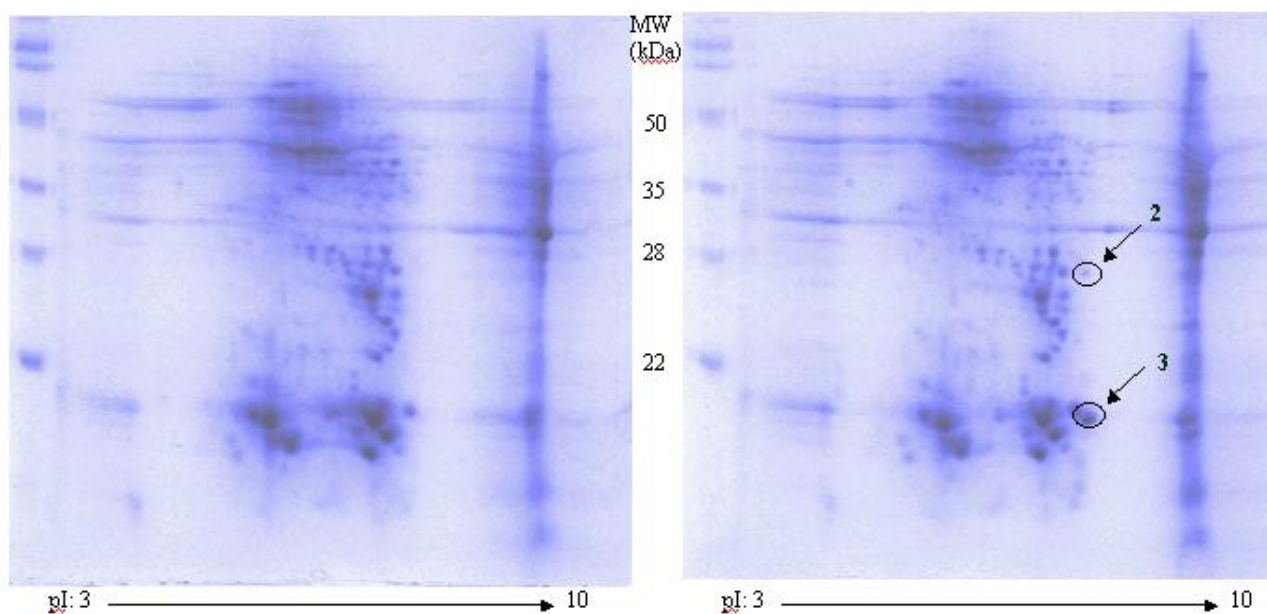
A szárazság-stressz hatására a transzgénikus búza vonalakban: T-117, T-106-3/a és T-128 keletkező stressz-indukált fehérjéket vizsgáltuk kétdimenziós elektroforézis és tömegspektrometriás technikákkal. A szülői és a transzgénikus búza vonalak só- és vízzoldható fehérjéit első dimenzióban pH: 3-10 tartományban, második dimenzióban pedig 7-90 kDa között szeparáltuk. Az izoelektromos fókuszálást 7 ill. 17 cm-es immobilizált pH gradienst tartalmazó stripen végeztük.

A stresszelt szülői és a transzgénikus búza vonalak fehérje-térképében eltérést mutattunk ki az alacsonyabb molekulatömeg tartományban: a T-106-3/a vonalnál 19-21 kDa és pI 6,5-7,5 tartományban (11. ábra), a T-117 esetében 28 kDa, pI 7-nél és 20 kDa, pI 7-nél (12. ábra) és a T-128 mintánál 16-18 kDa tartományban, pI 7,5-nél (13. ábra). A különbség-fehérjéket tömegspektrometriával azonosítottuk.



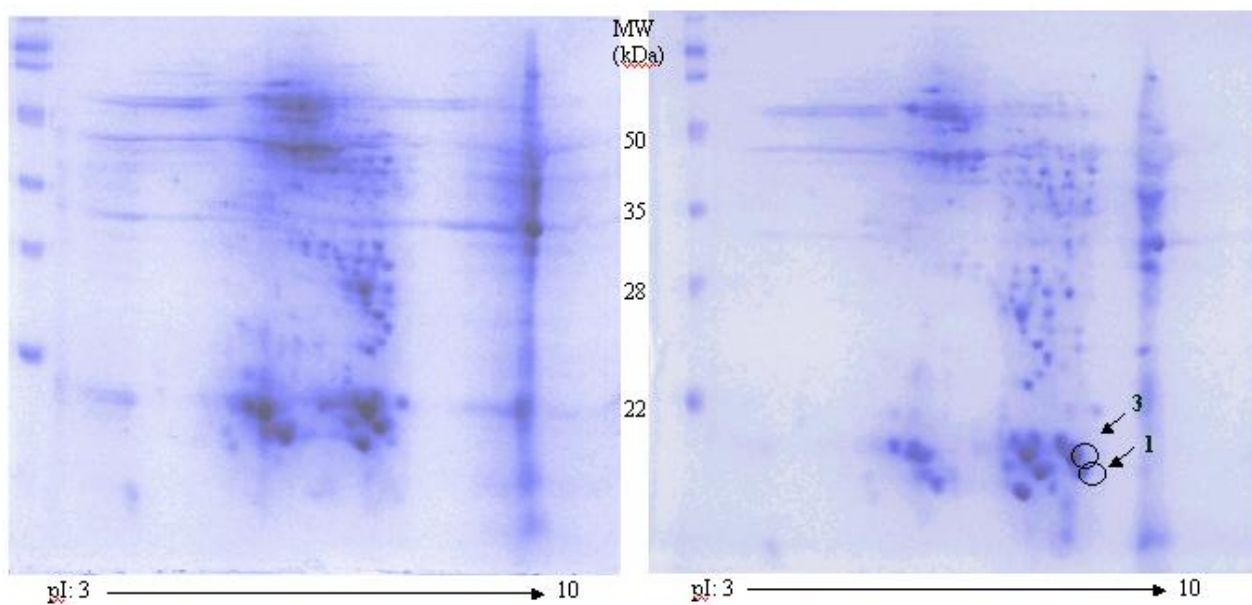
11. ábra

Szülői és transzgénikus (T-106/ 3a) búza albumin-globulin frakciójának 2DE elválasztási képe



12. ábra

Szülői és transzgénikus (T-117) búza albumin-globulin frakciójának 2DE elválasztási képe



13. ábra

Szülői és transzgénikus (T-128) búza albumin-globulin frakciójának 2DE elválasztási képe

A transzgénikus vonalak albumin-globulin frakciójából meghatározott fehérjék MS adatait az 5. táblázatban foglaltuk össze.

5. táblázat: A transzgénikus vonalak albumin-globulin frakciójából MALDI-TOF MS módszerrel azonosított fehérjék adatai

Folt száma	Azonosított fehérje	Azonosító szám	Rendszertani név	Szekvencia lefedettség (%)	Kalkulált MW-pI	MS/MS alapján azonosított szekvencia
1	α -amiláz/tripszin inhibitor CM1 prekursora	S10027 P16850	<i>Triticum aestivum</i>	57 ^a	16077 – 7,49	
2	27K fehérje	BAC76688	<i>Triticum aestivum</i>	17 ^b	22773 – 6,06	(K)HREWESCFQK(Q), (K)VHVAIYYESLCPYSVR(F), (K)GYPLLEARCR(S)
3	α -amiláz inhibitor 0.19	AAV39515	<i>Triticum aestivum</i>	83 ^a	13265 – 7,46	(K)EHGAQEGQAGTGAFPR(C), (R)DCCQQLAHISEWCR(C), (R)LPIVVDasGDGAYVCK(D)
4	Endogén α -amiláz/szubtilizin inhibitor (WASI)	P16347	<i>Triticum aestivum</i>	16 ^b	19633 – 6,77	DPPPVHDTDGNELR(A), (R)HVITGPVRDPSPGR(E)

^aszekvencia lefedettség MALDI-TOF technikával meghatározott „peptid ujjlenyomat (peptide mass fingerprint)” alapján

^bszekvencia lefedettség MALDI-ioncsapda készüléken meghatározott aminosav szekvencia alapján

A búza albumin-globulin frakciójában az α -amiláz/tripszin inhibitor család számos tagja megtalálható, a T-128 mintából származó különbségfehérjét (13. ábra) 57%-os szekvencia lefedettséggel az α -amiláz/tripszin inhibitor CM1 prekursoraként azonosítottuk. Az α -amiláz/tripszin inhibitor fehérjecs család egy másik izoformját a 0,19 dimer α -amiláz inhibitor (12. ábra) mutattuk ki a T-117 transzgénikus vonalban. Endogén α -amiláz/ szubtilizin inhibitor (WASI) detektáltunk a T-106-3/a mintában (11. ábra). A T-117 transzgénikus vonalban ismeretlen funkcióval rendelkező, irodalmi adatok alapján allergén tulajdonságú fehérjét, 27K proteint azonosítottunk különbségfehérjeként (12. ábra).

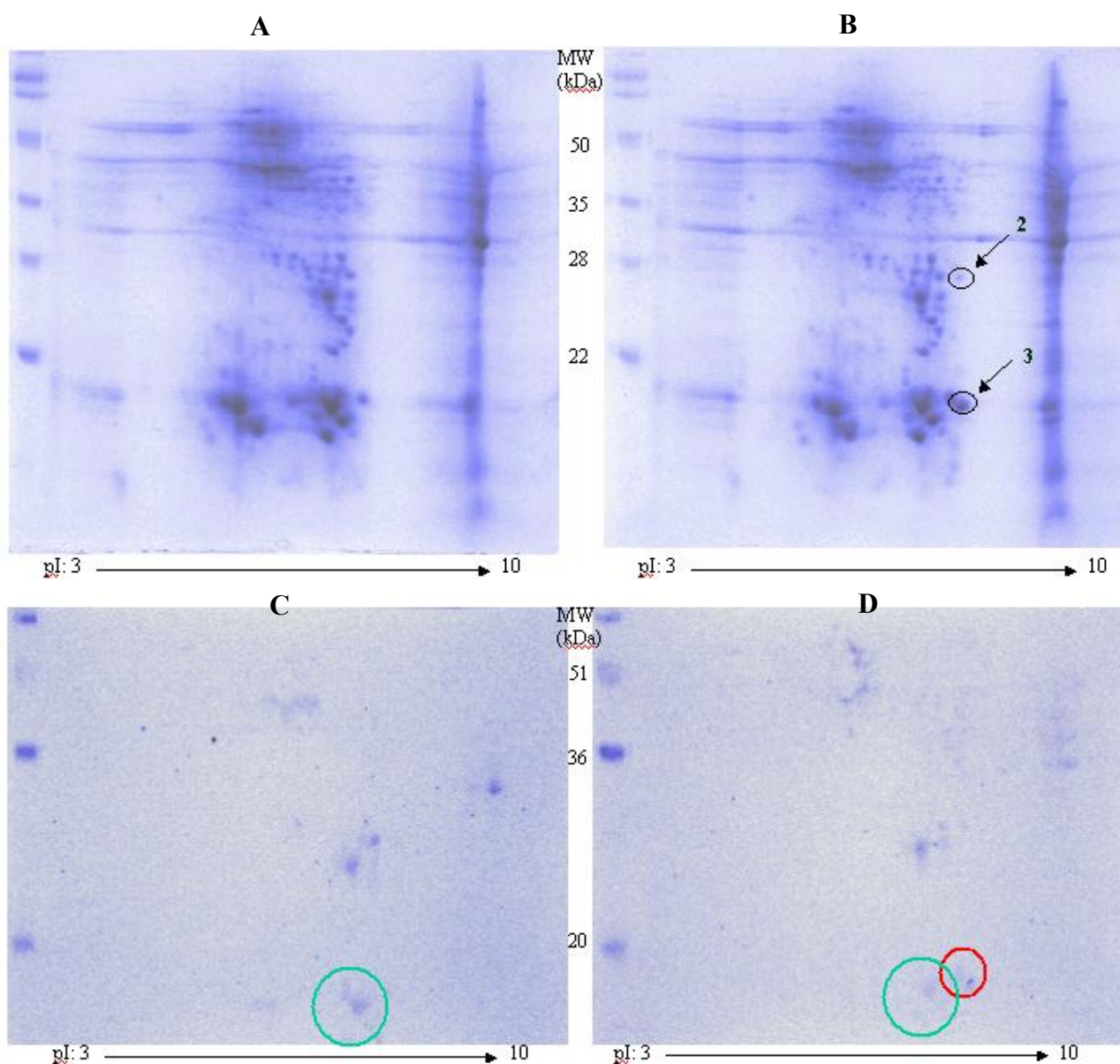
A vizsgált transzgénikus búza vonalakban szárazság-stressz hatására különbségfehérjéket detektáltunk, ezek az α -amiláz/tripszin inhibitor CM1 prekursor, a 0,19 dimer α -amiláz inhibitor, az endogén α -amiláz/szubtilizin inhibitor és 27K protein.

Stressz hatására történő megjelenésükből azt feltételezhetjük, hogy a vizsgált transzgénikus búza vonalak érzékenyebbek a szárazság-stresszre. Az α -amiláz/tripszin inhibitorok a növények védekező rendszerének fontos részeként a mikrobiális proteázok és amilázok működését gátolják,

ezek a fehérjék azonban a prolamin szupercsaládba sorolhatók, amely egyike a 3 legismertebb számos növényi allergént tartalmazó szupercsaládnak.

V. 3. 2. Szárazság-stressz hatásának vizsgálata szülői és transzgénikus búza vonalak albumin-globulin fehérjéinek biológiai aktivitására

A szülői és a T-117 transzgénikus búza vonal víz- és só-oldható fehérjéinek immunreaktivitását kétdimenziós elektroforetikus elválasztás (pH: 3-10 és 10-90 kDa között) és blottolás után gabona-allergia pozitív humán szérummal szemben vizsgáltuk (14. ábra).



14. ábra

A szülői (A) és a T-117 transzgénikus (B) búza vonal albumin-globulin frakcióinak 2 DE képe és az immunreakciók (IgE) eredménye (C és D)

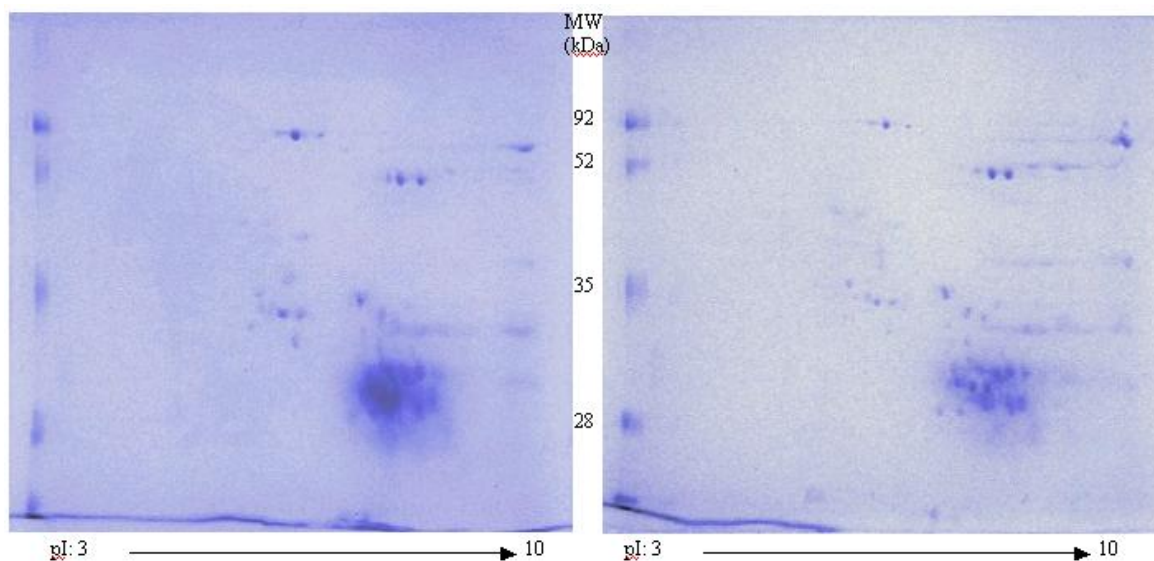
IgE reaktív fehérjéket a szülői (14. ábra, C) és a T-117 transzgénikus (14. ábra, D) búza vonal albumin-globulin frakciójában detektáltunk a 40-45 kDa molekulatömeg tartományban, pH: 6–6,5 között. Immunreaktív tulajdonságot szintén mindkét vizsgált mintában kimutattunk a 27 kDa molekulatömegű és pI:7 izoelektromos pontú fehérjék esetében.

A vizsgált transzgénikus búza vonalban szárazság-stressz hatására szintetizálódott különbségfehérje, a 0,19 dimer α -amiláz inhibitor (14. ábrán piros jelzéssel kiemelt), amelynek IgE-kötő képességét figyeltük meg a 20 kDa alatti molekulatömeg tartományban.

V. 3. 3. Szárazság-stressz hatásának vizsgálata szülői és transzgénikus búza vonalak gliadin-glutenin fehérjéinek mintázatára

A szárazság-stressz hatását a vizsgált szülői és transzgénikus T-128 búza vonal tartalék fehérjeiben is nyomon követtük. Szántóföldi tanulmányok alapján bizonyos környezeti körülmények (hőmérséklet, trágyázás) ugyanis befolyásolhatják a glutén fehérjék mennyiségét, összetételét és polimerizációját (Dupont és Altenbach, 2003). A hőmérséklet hatása a tartalék fehérjék összetételére nem teljesen ismert, de genotípustól függően igen változó. Magas hőmérséklet hatására megfigyelték a gliadin arányának növekedését a gluteninnel szemben (Corbellini és mtsai., 1997).

A stresszelt szülői és a transzgénikus T-128 búza vonal gliadin-glutenin fehérjeit pH: 3-10 és 14-100 kDa közötti molekulatömeg tartományban elválasztva vizsgáltuk (15. ábra)



15. ábra

Szülői és transzgénikus (T-128) búza gliadin-glutenin frakciójának 2DE elválasztási képe

A kétdimenziós fehérje-térképen nem detektáltunk eltérést a szülői és a transzgénikus búza vonal (T-128) tartalék fehérjéinek összetételében.

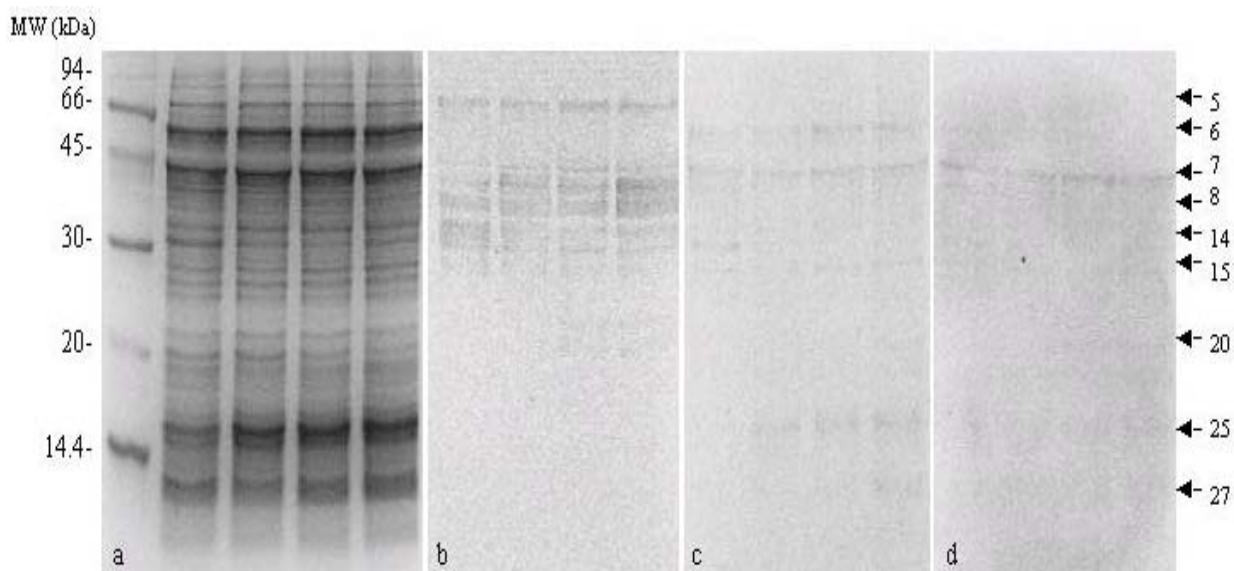
A szülői és a transzgénikus búza tartalék fehérje-összetételének összehasonlító vizsgálata során megállapítottuk, hogy a transzgénikus vonal nem reagált érzékenyebben a szárazság-stresszre.

V. 4. Marko tritikále fehérje-összetételének és biológiai aktivitásának vizsgálata az érés függvényében

Kísérleteinkben Marko tritikále virágzás után 7., 14., 21. és 28. napon learatott gabonaszemek fehérje-összetételét hasonlítottuk össze egydimenziós és kétdimenziós gélelektroforézissel. Immunblot technikával megvizsgáltuk az eltérő érési állapotban lévő fehérjék IgA-, IgE- és IgG-kötő képességét is.

V. 4. 1. Marko tritikále albumin-globulin fehérjék immun-reaktív jellegének változása az érés során

A Marko tritikále víz- és só-oldható fehérjéinek immunreaktivitását SDS-PAGE elválasztás és blotolás után anti-gliadin antitest, valamint cöliakiás és gabona-allergiás humán szérumokkal szemben tanulmányoztuk (16. ábra).



16. ábra

Marko tritikále víz- és só-oldható fehérjéinek (1: molekulatömeg standard, majd a 7., 14., 21. és 28. napon aratott gabonaszemek) SDS-PAGE képe (a) és az immunreakciók eredménye IgG (b), IgE (c) és IgA (d)

Az albumin-globulin fehérjék IgG-kötő képességét detektáltuk 30-70 kDa között és 22 kDa-nál (16. ábra, 20. sáv), IgE reaktivitást mutattak a 27-58 kDa és a 7-16 kDa molekulatömeggel rendelkező fehérjék, az IgA-kötő polipeptideket pedig 7, 16 és 43 kDa-nál figyeltünk meg.

A kb. 70 kDa körüli tartományban megjelent fehérjék IgG reaktivitása erős, a vizsgált cöliákias és gabona-allergiás humán szérumokkal szemben azonban nem jeleztek immunreaktivitást (16. ábra, 5. sáv).

Az érési állapot függvényében növekvő IgE-kötő képességet detektáltunk az 58 kDa molekulatömeggel rendelkező fehérjéknél, ugyanakkor IgG-, és IgA-kötő epitópokat nem tartalmaznak (16. ábra, 6. sáv).

Az adott vérszérumok alkalmazásával a 44 kDa körüli tartományban detektált fehérjéknek (16. ábra, 7. sáv) mind az IgE, mind az IgA reaktivitása növekedést mutatott az érés során.

Amíg az SDS-PAGE elválasztási képen az érési állapot függvényében csökkenő intenzitást mutatott a 8 jelzésű fehérjesáv, az IgG reaktivitásának növekedését tapasztaltuk a blottolás után.

Érdekes módon a 32 kDa molekulatömegű fehérje csak az érés első fázisában képezett komplexet az IgE-vel (16. ábra, 14. sáv). A 28 kDa-nál detektált fehérjék az SDS-PAGE kép alapján növekvő relatív denzitást mutattak az érés során, valamint gabona-allergiás humán szérummal szemben jelzett immunreaktivitásának a növekedését figyeltük meg.

Az érés során a 20 kDa körüli tartományban megjelent fehérje mennyisége szignifikánsan csökkent és csekély IgG-kötő képességet mutattunk ki.

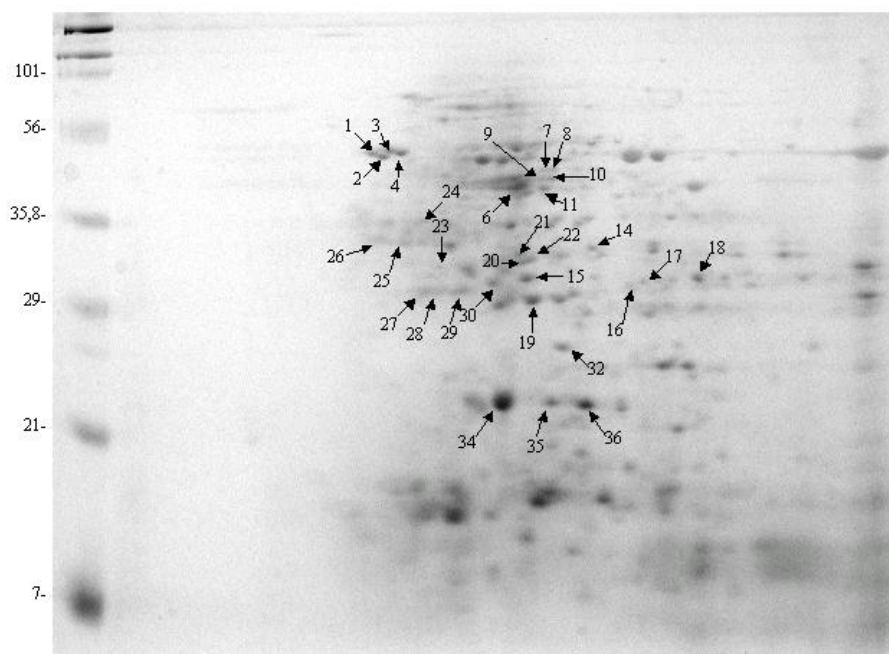
A 25 és 27 jelzésű fehérjesávok eltérő mértékben, de jeleztek immunreaktivitást a vizsgált cöliákiás és gabona-allergiás humán szérumokkal szemben is.

V. 4. 2. Marko tritikále albumin-globulin frakcióinak összehasonlító vizsgálata az érési állapot függvényében

Virágzás után a 7. és a 28. napon learatott tritikále minták fehérje-összetételének változását követtük nyomon, az albumin-globulin frakciók fehérjéit első dimenzióban pH: 3-10 tartományban fókuszáltuk, majd a második dimenzióban a mintákat 15%-os SDS-PAGE futtatással molekulatömegük szerint választottuk el (17. és 18. ábra).

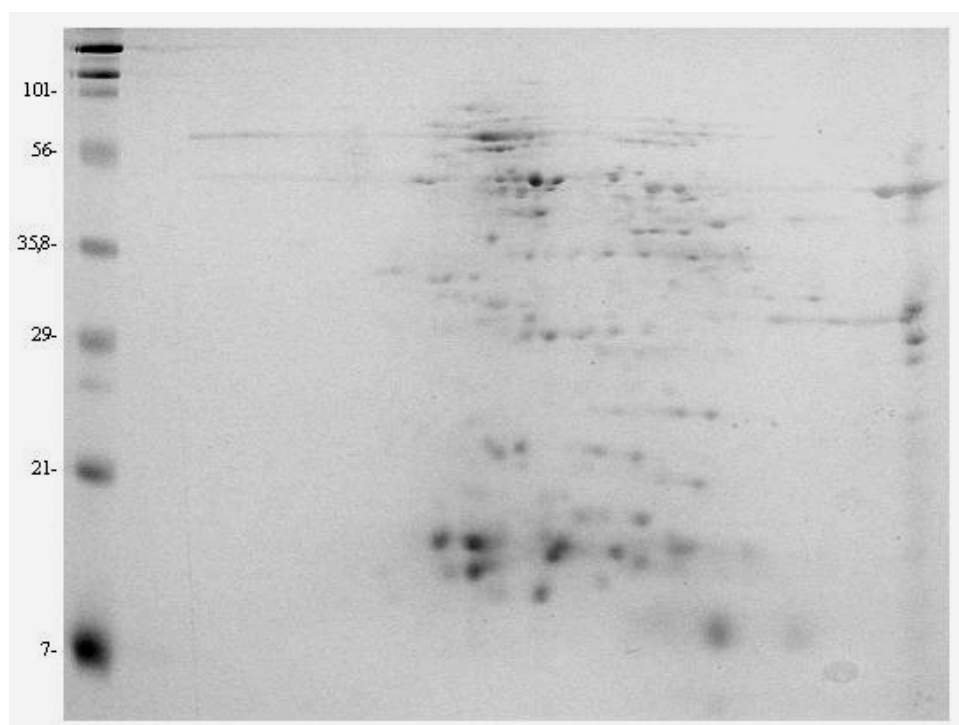
Eredményeink szerint a tritikále érésének korai szakaszában minőségét és mennyiségét tekintve egyaránt több fehérje expresszáldott, mint az érett állapotú magvakban. Éretlen (17 DPA) és érett (45 DPA) búzaminták endoszperm fehérjéinek összehasonlító vizsgálatakor szintén megfigyelték a fehérje-mintázat heterogenitásának csökkenését az érés folyamán (Skylas, 2000).

Az éretlen (7 DPA) és az érett (28 DPA) tritikále minták kétdimenziós fehérje-térképének összehasonlítása alapján harminchat olyan fehérjefoltot detektáltunk az érés korai szakaszából származó szemekben, amely nem jelent meg az érett állapotú magvakban. A különbségként detektált fehérjéket kivágtuk a gélből, tripszines emésztés után MALDI-TOF MS technikával búza és árpa szekvenciák alapján határoztunk meg (6. táblázat).



17. ábra

Éretlen (7 DPA) Marko tritikále só- és vízdoldható fehérjéinek kétdimenziós fehérje-térképe és a MALDI-TOF MS módszerrel azonosított fehérjék jelölése



18. ábra

Érett (28 DPA) Marko tritikále só- és vízdoldható fehérjéinek kétdimenziós fehérje-térképe

6. táblázat: Az éretlen (7 DPA) Marko tritikále albumin-globulin frakciójából MALDI-TOF MS módszerrel azonosított fehérjék adatai

Folt száma	Azonosított fehérje	Rendszertani név	Azonosító szám (Swissprot/ Genebank)	Kalkulált pI	Kalkulált MW-
1 2 3 4	HSP70	<i>Triticum aestivum</i>	AAB99745	5,14	71385
6 15 17 18 24	szerpin	<i>Triticum aestivum</i>	CAA72273	5,44	43120
7 8 9 10	gliceralehid 3-foszfát dehidrogenáz	<i>Hordeum vulgare</i>	CAA42901	6,67	36605
11	gliceralehid 3-foszfát dehidrogenáz	<i>Hordeum vulgare</i>	P08477	6,2	33443
14 20 21 22	glükóz/ribitol dehidrogenáz homológ – árpa	<i>Hordeum vulgare</i>	T06212	6,54	31912
16	27K fehérje	<i>Triticum aestivum</i>	BAC76688	6,06	23271
19	peroxiredoxin	<i>Hordeum vulgare</i>	CAA65387	6,31	24176
23	putative In2.1 protein	<i>Triticum aestivum</i>	CAA76758	5,38	27249
25 26	szerpin	<i>Triticum aestivum</i>	CAB52710	5,46	43341
27	HSP26	<i>Triticum aestivum</i>	AAC96316	7,88	26653
28	HSP26	<i>Triticum aestivum</i>	AAC96314	9,36	26539
29	triózfoszfát izomeráz	<i>Triticum aestivum</i>	CAC14917	5,38	27014
30	szerpin	<i>Triticum aestivum</i>	CAA90071	5,6	43262
34	unnamed protein product	<i>Triticum aestivum</i>	CAA31785	5,83	16868
35	HSP 16.9B	<i>Triticum aestivum</i>	CAA45902	6,19	16857

Chaperonok

Az éretlen (7 DPA) Marko tritikále albumin-globulin frakciójában 3 különböző molekulatömegű hőszokk fehérjét határoztunk meg. Az 1, 2, 3 és 4 fehérjefoltok MS/MS analízis alapján homológiát mutattak búza HSP70-nel. A hőszokk fehérjék jelentősége messze túlmutat a magas hőmérséklet elleni védelemben betöltött szerepükön. A HSP70 szupercsalád egyes tagjai konstitutívan termelődhetnek, ugyanakkor ismeretes, hogy egyes nehézfémek, oxigénhiány is

kiváltják a HSP-k szintézisét (Miernyk, 1999). Alacsony molekulatömegű: HSP26 és HSP16,9B polipeptideket azonosítottunk a 27, 28 és 35 fehérjefoltokban.

Védőfehérjék

Vizsgálataink során a szerin proteáz inhibitor különböző molekulatömeggel és izoelektromos ponttal jellemezhető 6, 15, 17, 18 és 24 jelzésű fehérjefoltokban is detektáltuk az éretlen tritikáléban. Irodalmi adatok szerint a búzában a serpin több izoformja is megtalálható (Ostergaard, 2000). Az inhibitor aktív centruma a tartalék fehérjékre jellemző, glutaminban és prolinban gazdag szekvenciával rendelkezik, gátolja a tartalék fehérjék idő előtti proteolízisét (Hejgaard, 2001).

Metabolikus fehérjék

A szénhidrát metabolizmusban részt vevő enzimek közül gliceraldehid-3-foszfát dehidrogenázt (7, 8, 9, 10, 11), glükóz/ribitol dehidrogenázt (14, 20, 21, 22) és triózfoszfát izomerázt (29) azonosítottunk az érés korai szakaszában.

Antioxidáns fehérjék

A számos növényben expresszáldó peroxiredoxin (19) jelentős szerepet tölt be a fotoszintetikus apparátus védelmében, pl.: a reaktív oxigénnel vagy a lipid peroxidációval szemben (Rouhier és Jacquot, 2005).

Egyéb fehérjék

Eredményeink szerint már az érés kezdeti szakaszában kimutatható az ismeretlen funkcióval rendelkező, allergén jelleget mutató 27K fehérje.

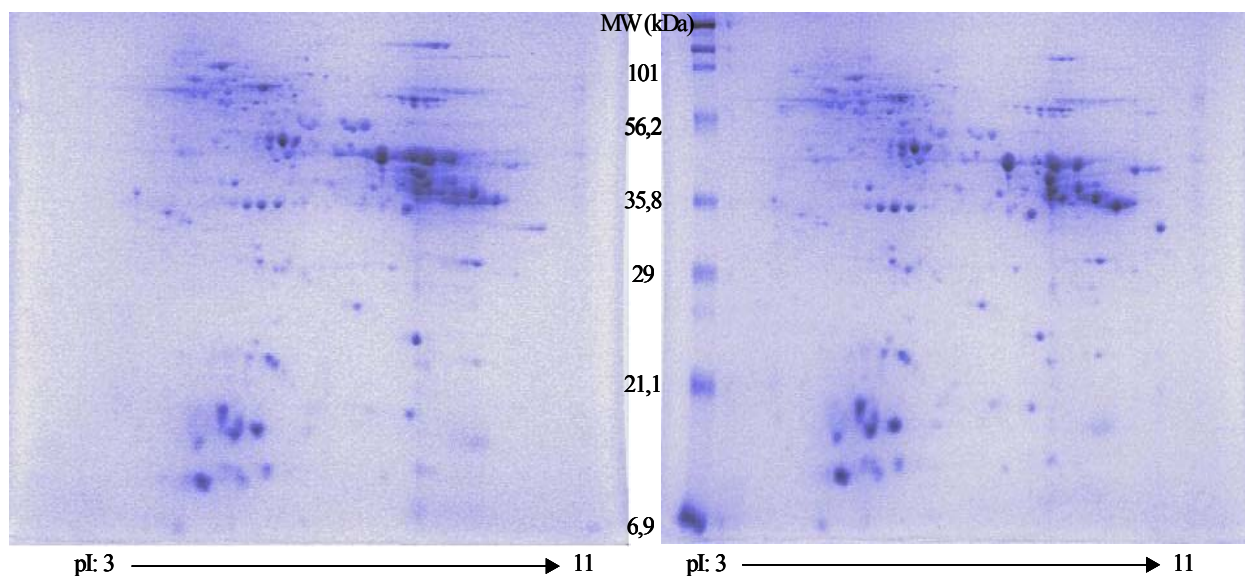
Marko tritikále só- és vízzoldható fehérjéinek változását tanulmányoztuk az érés során. Az érés kezdeti szakaszában nagyobb mennyiségben expresszáldtak a szénhidrát metabolizmusban részt vevő enzimek, az antioxidáns fehérjék, a védő- és a stresszfehérjék. Az elkészített fehérje-térképek hozzájárulhatnak azon jövőbeli kutatásokhoz, amelyek a fajta és a környezet hatását vizsgálják a gabona fejlődésére és minőségére.

A gabonaszem érése során lejátszódó biokémiai folyamatok jobb megértését nagymértékben elősegíti a proteomika alkalmazása az érésdinamikai vizsgálatokban.

V. 5. Szárazság-stressz hatásának vizsgálata különböző tavaszi árpa vonalak fehérje-mintázatára

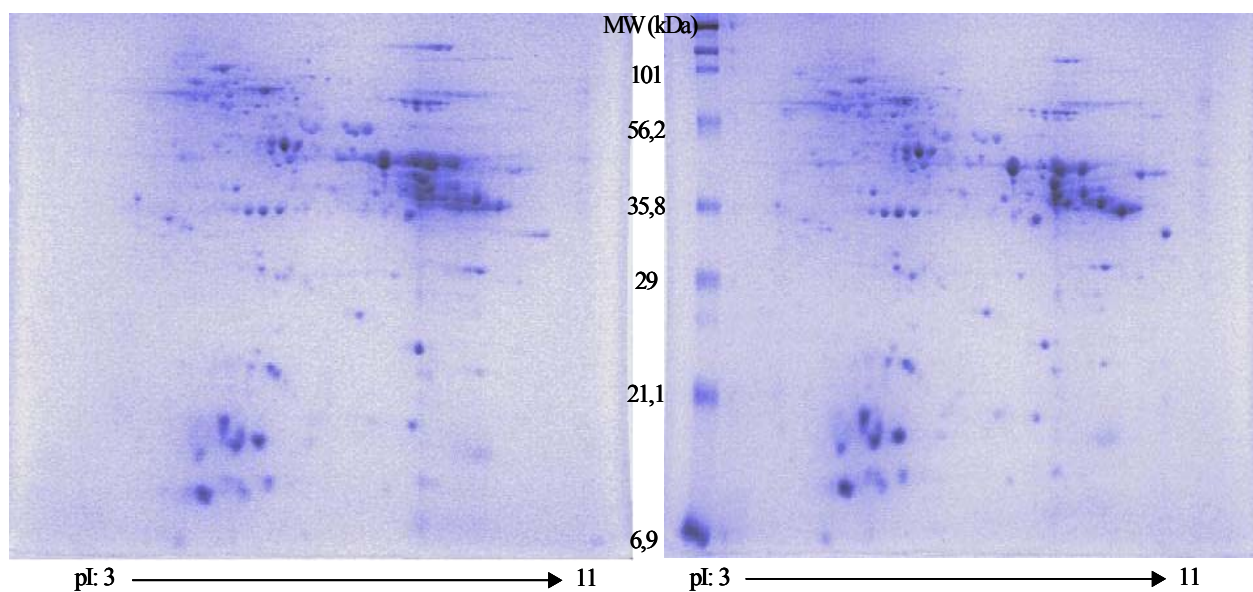
A minőségi sör jellemzője a jó habképződés és habtartósága, melyet a habképző tulajdonsággal rendelkező fehérjék nagymértékben meghatároznak. Vizsgálatainkban négy tavaszi árpafajta –Scarlett, Jubilant, Pasadena, Mandolina- fehérje-összetételének összehasonlító vizsgálatát végeztük el a stressz függvényében. Az optimális körülmények között termesztett (Sopronhorpácsról származó) árpaminták magfehérjéit hasonlítottuk össze a szárazság stressznek (Táplánszentkeresztről származó) kitett mintacsoporttal.

A fehérjéket első dimenzióban pH: 3-11 tartományban fókuszáltuk nemlineáris pH gradienst tartalmazó stripen, majd a második dimenzióban 15%-os SDS-PAGE futtatással molekulatömegük szerint szeparáltuk (19.-22. ábra).



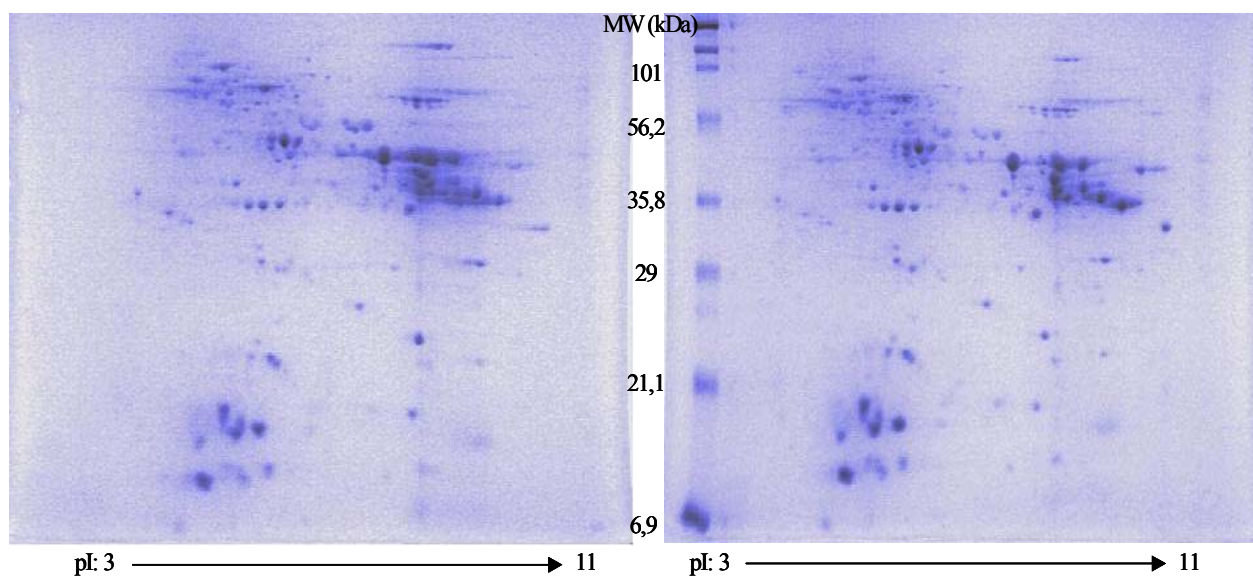
19. ábra

Optimális körülmények között termesztett és szárazság stressznek kitett
Jubilant tavaszi árpa minták 2-DE képei



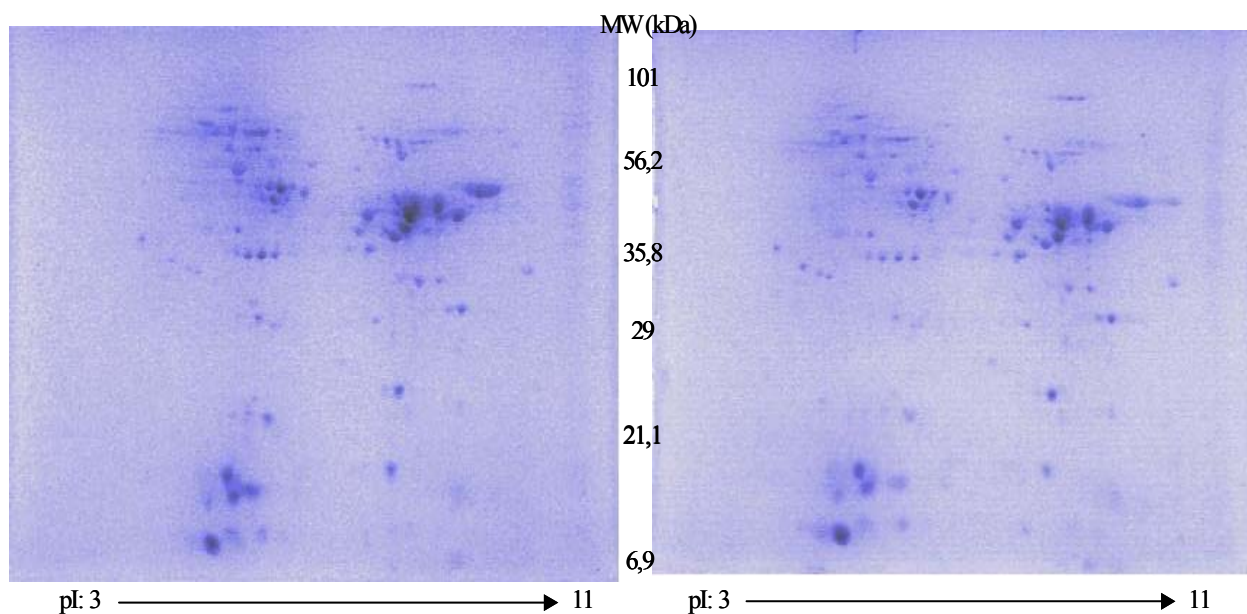
20. ábra

Optimális körülmények között termesztett és szárazság stressznek kitett
Mandolina tavaszi árpa minták 2-DE képei



21. ábra

Optimális körülmények között termesztett és szárazság stressznek kitett
Pasadena tavaszi árpa minták 2-DE képei



22. ábra

Optimális körülmények között termesztett és szárazság stressznek kitett
Scarlett tavaszi árpa minták 2-DE képei

A szárazság-stressz hatását az elektroforetogramok alapján elemezve azt tapasztaltuk, hogy annak hatására a stresszelt négy tavaszi árpafajta –Scarlett, Jubilant, Pasadena, Mandolina – fehérje-összetétele nem változott meg a kontrol mintákhoz képest.

A Corvinus Egyetem Sör- és Szeszipari Tanszékén végzett vizsgálatok megállapították, hogy a stresszelt és az optimális körülmények között termesztett árpákból készített sörök habtartóssága nem mutat szignifikáns eltérést.

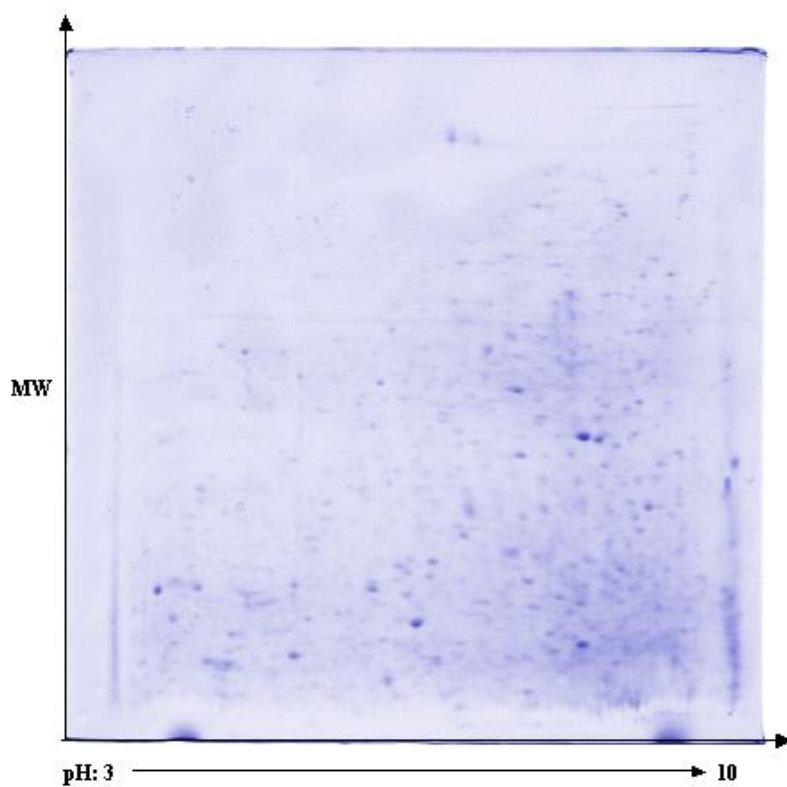
Eredményeink azt jelezték, hogy a vizsgált évjáratban a talaj-előkészítéssel kapcsolatos környezeti hatások nem okoztak olyan mértékű stresszt az árpanövények számára, hogy befolyásolja annak fehérje-összetételét, illetve a söripari tulajdonságokat.

V. 6. Kétdimenziós elektroforézis és LC-MS/MS technika alkalmazása hőstressz hatására képződött bakteriális fehérjék kimutatására és szekvenálására

A proteomikai vizsgálatokban az elválasztott fehérjék azonosítására leggyakrabban a nagy érzékenységű elektrospray (ESI) és a mátrixhoz kötött lézer ionizációs – „repülési idő” (MALDI-TOF) tömegspektrométereket alkalmazzák. A tömegspektrometriás analízissel nyert fragmenseket összevetik az adatbázisban található fehérjéből származó peptidtömegekkel, hogy azonosítsák a fehérjét. A módszer azonban nem teszi lehetővé a homológia alapján történő azonosítást, nem alkalmazható olyan organizmus tanulmányozására, amelynek genomja még nem teljesen ismert. Kétdimenziós elektroforézissel elválasztott fehérjék tripszines fragmensei ilyen esetben LC-MS/MS technikával szekvenálhatóak és homológia alapján azonosíthatóak.

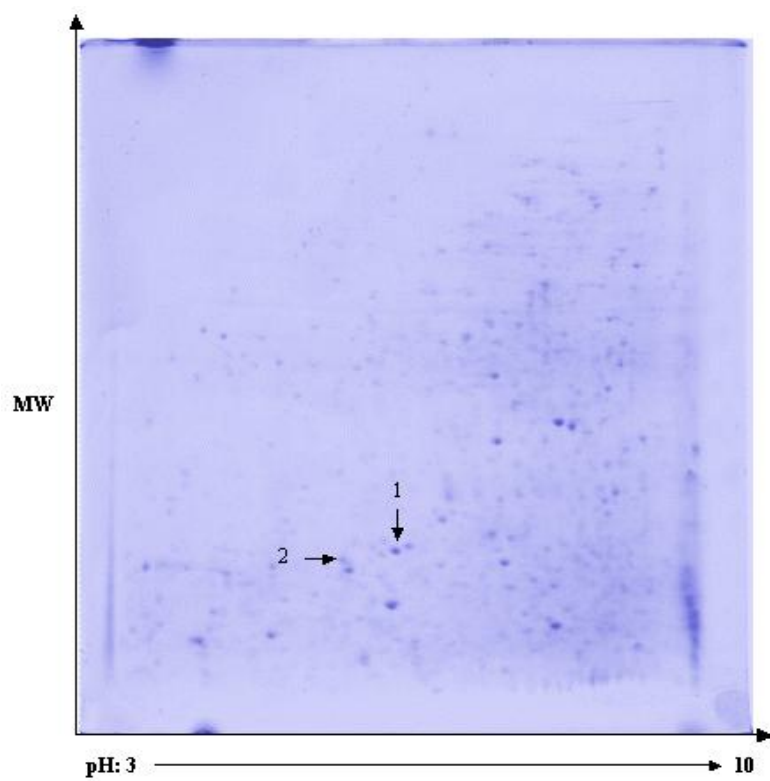
Kontroll, illetve hőkezelt (37 °C, 1 óra) *Shewanella hannedei* baktérium fehérjekészletének összehasonlító vizsgálatát végeztük el elválasztás-technikai módszerek kombinálásával. A hidegtűrő, egészen alacsony hőmérsékleten is szaporodni képes baktérium, hőstresszre adott válaszát követtük nyomon.

A fehérje extraktumokat kétdimenziós elektroforézissel (2-DE) választottuk el. Első dimenzióban izoelektromos fókuszálást (IEF) végeztünk pH: 3-10 tartományban. A második dimenzióban a mintákat 10%-os SDS-PAGE futtatással molekulatömegük szerint szeparáltuk. Coomassie-festést követően a kontroll (23. ábra) illetve a hőkezelt (24. ábra) baktérium minták géljeinek kiértékelését PDQUEST szoftverrel végeztük.



23. ábra

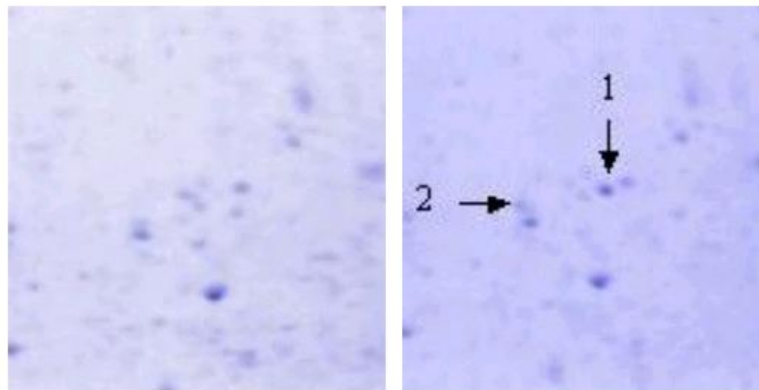
Kontroll *Shewanella hannedei* baktérium fehérjéinek 2-DE képe



24. ábra

Hőkezelt (37 °C, 1 óra) *Shewanella hannedei* baktérium fehérjéinek 2-DE képe

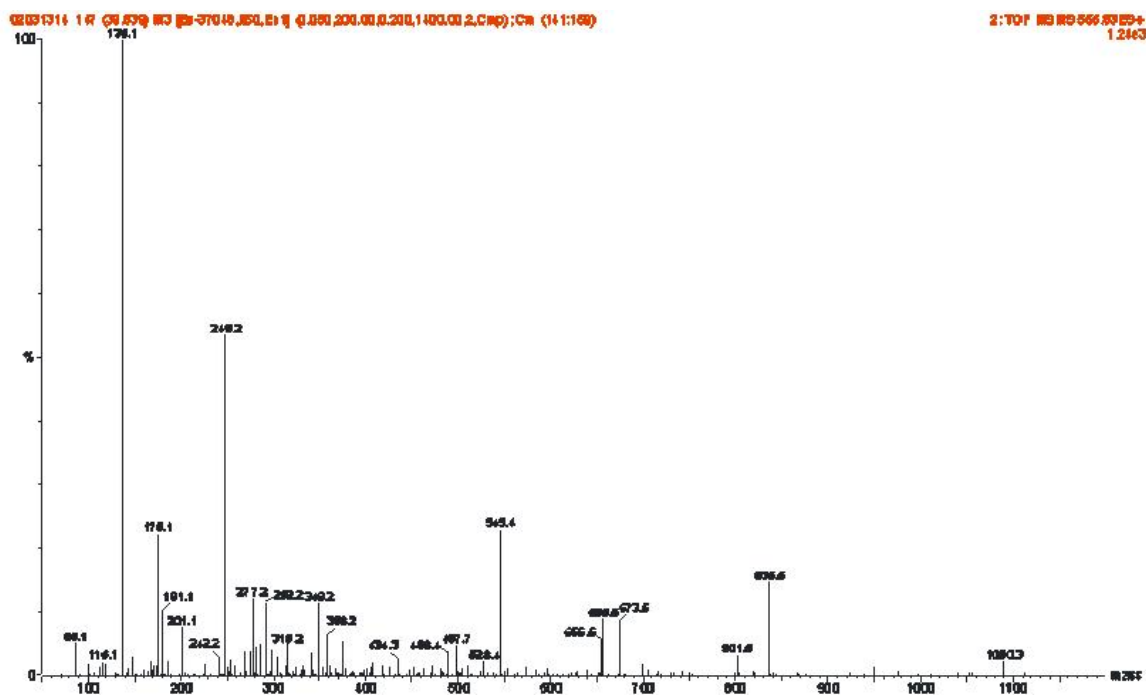
A kontroll és a hőkezelt *Shewanella hanedei* baktérium fehérjemintázatában 2 eltérést mutattunk ki, az 1 és 2 jelzéssel ellátott fehérjefoltot a 25. ábra nagyítva mutatja.



25. ábra

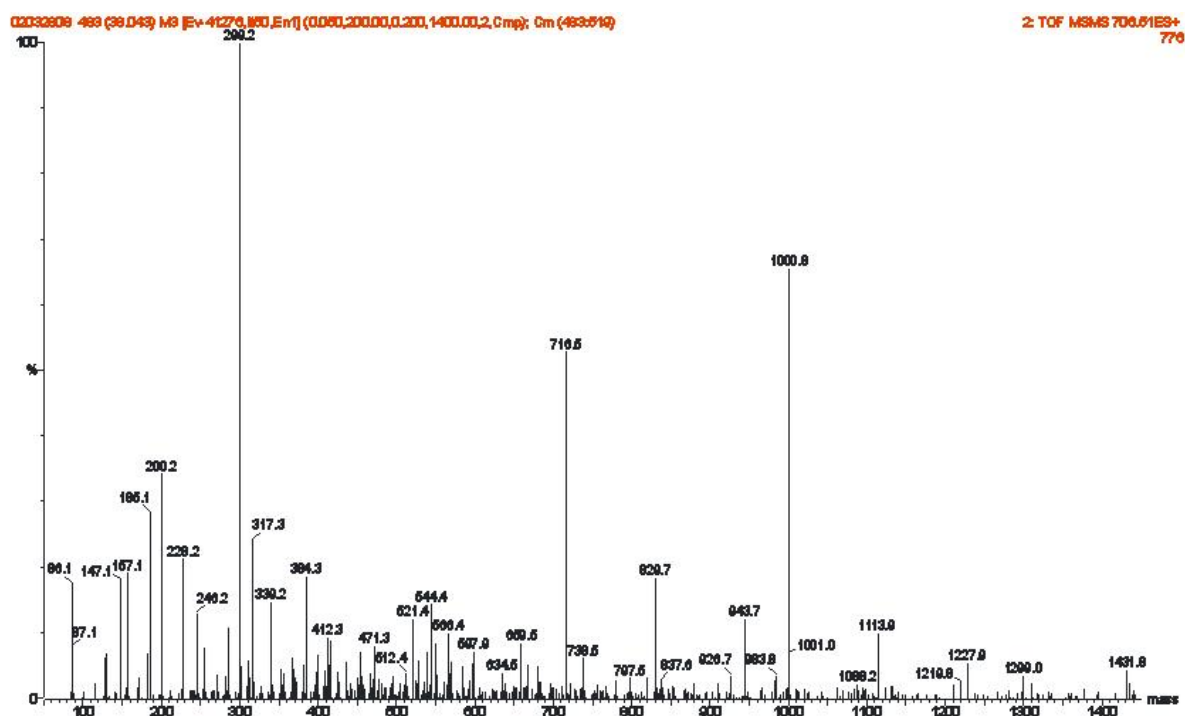
Kontroll ill. hőkezelt (37 °C, 1 óra) *Shewanella hanedei* baktérium fehérjemintázatában detektált eltérések

A különbségként detektált fehérjéket extraháltuk, majd tripszinnel hidrolizáltuk. A peptidek aminosav szekvenciáját LC-MS/MS technikával határoztuk meg, az MS/MS spektrumokat (26. és 27. ábra) manuálisan értékeltük ki.



26. ábra

A hőkezelt *Shewanella hanedei* baktériumban különbségként detektált 1 jelzésű fehérje LC-MS/MS spektruma



27. ábra

A hőkezelt *Shewanella haredi* baktériumban különbséggént detektált 2 jelzésű fehérje LC-MS/MS spektruma

A hőkezelt *Shewanella haredi* baktériumban különbséggént detektált 1 jelzésű fehérjének LC-MS/MS spektrumából egy Tyr-Leu-Tyr-Gln-Gly-Leu-Ala-Glu-Arg szekvenciával rendelkező peptidet határoztunk meg, amelyet az NCBI (National Centre of Biotechnology Information) adatbázis Blast algoritmusával hősokk-fehérjeként azonosítottunk. A 2 jelzésű fehérje szekvenálásának eredménye egy Ala-Asn-Leu-Gly-Asn-Leu-Gly-Asp-Gln-Val-Ala-Val-Lys peptid, ami az adatbázis alapján egy 50S riboszóma fehérjének felelt meg (7. táblázat).

7. táblázat: A hőkezelt *Shewanella haredi* baktériumban különbséggént detektált fehérjék LC-MS/MS vizsgálattal meghatározott aminosav-szekvenciája és az NCBI adatbázis alapján azonosított fehérjék

Fehérjefolt jele	Azonosított szekvencia	Azonosított fehérje
1	YLYQGLAER	Hősokk-fehérje
2	ANLGNLGDQVAVK	50S Riboszóma fehérje

A kontroll, illetve a hőkezelt *Shewanella hannedei* baktérium fehérjekészletének összehasonlító vizsgálata alapján kétdimenziós elektroforézis és LC-MS/MS technika alkalmazásával azonosítottunk egy hősokk-fehérjét illetve egy 50S riboszóma fehérjét. Az alkalmazott elektroforetikus és kromatográfiás technikákkal lehetőség van tehát olyan organizmusból származó fehérjék azonosítására is, amelyről kevés információ áll a rendelkezésünkre.

Eredményeink szerint az adott hőkezelés hatására a baktérium egy hősokk-fehérjét szintetizált, valamint egy a fehérjeszintézisben szerepet játszó riboszomális fehérje mennyiségének növekedését tapasztaltuk. A hidegtűrő baktériumok sajátossága, hogy speciális fehérjék szintézisével képesek megvédeni az örökítő anyagukat. Hőkezelés hatására a vizsgált pszichrofil baktérium fehérje-készletében végbement változást azt mutatja, hogy az alacsony szaporodási hőmérséklettel (16 °C) rendelkező baktérium a magas hőmérséklettel szemben is toleráns.

VI. ÖSSZEFOGLALÁS

Munkánk során a napjainkban leginkább az orvostudományi és a gyógyszerészeti kutatásokban elterjedt proteomikai vizsgálatokat alkalmaztuk az élelmiszertudomány területén.

Hereward őszi búzából Osborne szerinti frakcionálással előállított fehérjefrakciók proteomikai tanulmányozását végeztük el, majd az azonosított, ismert búzaallergéneket tartalmazó víz- és só-oldható frakció fehérjéit hidrofób kölcsönhatási kromatográfiával szeparáltuk. Proteomikai vizsgálataink szerint az allergén jelleggel rendelkező polipeptidek közül a 0,19, a 0,53 α -amiláz inhibitor és a 27K fehérje hidrofób, míg a szerin proteáz inhibitor, a glioxaláz I, a 0,28 α -amiláz inhibitor és az ubikvitin hidrofil tulajdonsággal jellemezhető.

Nyomon követtük a környezeti változás (szárazság-stressz) hatását szülői és transzgénikus búza vonalak fehérje-összetételében. A stresszelt szülői és transzgénikus búza vonalak fehérje-térképében eltérést mutattunk ki az alacsonyabb molekulatömeg (<28 kDa) tartományban. A proteomika segítségével a különbségfehérjék között azonosítottunk egy α -amiláz/tripszin inhibitor CM1 prekuzort, egy 0,19 dimer α -amiláz inhibitor, egy endogén α -amiláz/szubtilizin inhibitor és egy 27K proteint. Stressz hatására történő megjelenésükből azt feltételezzük, hogy a vizsgált transzgénikus búza vonalak érzékenyebbek a szárazság-stresszre. Immunreakcióval kimutattuk, hogy a különbségfehérjeként szintetizálódott 0,19 dimer α -amiláz inhibitor IgE-kötő epitópot tartalmaz.

Különböző tavaszi árpa vonalak fehérje-összetételének vizsgálatát és összehasonlítását végeztük el arra vonatkozóan, hogy hogyan változnak szárazság-stressz hatására. A kétdimenziós fehérje-térképek elemzése alapján azt tapasztaltuk, hogy a környezeti stressz hatására a stresszelt négy tavaszi árapajta –Scarlett, Jubilant, Pasadena, Mandolina – fehérje-összetétele nem változott meg a kontroll mintákhoz képest. Eredményeink azt mutatták, hogy a vizsgált évjáratban a talaj-előkészítéssel kapcsolatos környezeti hatások nem okoztak olyan mértékű stresszt az árpanövények számára, hogy befolyásolja annak fehérje-összetételét, illetve a söripari tulajdonságokat.

Tanulmányoztuk egy tritikále vonal (Marko) fehérje-összetételének és biológiai aktivitásának változását az érési állapot függvényében. A virágzás utáni 7., 14., 21. és 28. napon learatott gabonaszemek víz- és só-oldható frakcióit vizsgáltuk egydimenziós és kétdimenziós gélelektroforézissel. Az eltérő érési állapotoknak megfelelő fehérjék IgA-, IgE- és IgG-kötő képességének változását meghatároztuk. Proteomikai vizsgálataink alapján megállapítottuk, hogy az érés kezdeti szakaszában (7 DPA) nagyobb mennyiségben expresszálódtak a szénhidrát metabolizmusban részt vevő enzimek (glükóz/ribitol dehidrogenáz, triózfoszfát izomeráz), az antioxidáns fehérjék (peroxiredoxin), a védő- (szerin proteáz inhibitor) és a stresszfehérjék (HSP70, HSP26 és HSP16,9B).

Az élelmiszerbiztonság szempontjából jelentős gabonafehérjék proteomikai jellemzésére sikeresen alkalmaztuk a kétdimenziós gélelektroforézis és a MALDI-TOF MS technikákat. Eredményeink azt jelzik, hogy a környezeti változások gabonamagvak fehérje-összetevőire gyakorolt hatásának vizsgálata jelentős a fajtakiválasztás és az élelmiszerbiztonság szempontjából. Az érésdinamikai vizsgálatok során elkészített fehérje-térképek hozzájárulhatnak azon jövőbeli kutatásokhoz, amelyek a fajta és a környezet hatását vizsgálják a gabona fejlődésére és minőségére.

Proteomikai vizsgálatokat végeztünk egy olyan baktériumon is, melynek genomja és proteomja még fel nem térképezett, a fehérje azonosítást ebben az esetben homológia alapján végeztük el, elválasztás-technikai módszerek kombinálásával. A hőstressz hatását vizsgáltuk *Shewanella hannedei* baktérium fehérjekészletére, 2-DE elválasztás után LC-MS/MS technikával határoztuk meg a hőkezelt baktériumban stressz hatására különbséggént detektált fehérjéket. Az LC-MS/MS vizsgálatlal meghatározott aminosav-szekvenciák alapján azonosítottunk egy hősokk-fehérjét, illetve egy 50S riboszóma fehérjét.

Az újszerű megközelítést jelentő proteomikai vizsgálatok tehát lehetőséget adnak arra, hogy az élelmiszertudomány szempontjából jobban megérthessük az élelmiszerek minőségét befolyásoló tényezőket.

SUMMARY

The aim of our work was to apply proteomics widely used in medical and pharmaceutical research in the field of food science.

Osborne fractions of Hereward winter wheat were characterised by proteomic approaches. The albumin-globulin fractions containing the identified, known wheat allergenic proteins were then separated by hydrophobic interaction chromatography. The results obtained in proteomic analysis showed that the allergenic 0.19 and 0.53 alpha-amylase inhibitor, 27K protein has hydrophobic character while serpin, glyoxalase I, 0.28 alpha-amylase inhibitor, ubiquitin can be characterised as a proteins with hydrophilic properties.

The effect of drought stress on the protein composition of non-transgenic (parent) and its transgenic (wide-range herbicide resistant) spring wheat lines was investigated. The drought affected protein expression, mostly for the low molecular weight (<28 kDa) and putative stress-proteins were observed in transgenic lines. By means of proteomics, the differentially expressed proteins were identified. Some inhibitor proteins such as alpha-amylase/ trypsin inhibitor CM1 precursor, 0.19 alpha-amylase inhibitor, endogenous alpha-amylase/subtilisin inhibitor (WASI) and a 27K protein were dominant in the stressed transgenic lines, indicating that the examined transgenic lines were sensitive to drought stress. Using immunoblot techniques 0.19 alpha-amylase inhibitor was found to have IgE binding epitopes.

Proteomic approaches were used to determine the effects of drought stress on protein sets of different barley cultivars (Scarlett, Jubilant, Pasadena, Mandolina). The results obtained with two-dimensional mapping evaluation, the results did not shown differences in the protein composition of treated samples as compared with the control. The results showed that the environmental factors, in the season of the studies, did not induce so considerable stress on the barley plants to change the protein composition and brewing properties of the crop.

The changes in the protein composition and biological activity of Marko triticale as a function of maturation were studied. Water- and salt-soluble proteins were compared at 4 different stages of grain development (7, 14, 21, 28 day by post anthesis) using one and two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. The change in the IgA-, IgE- and IgG-binding capacity was studied in accordance with the maturity stages. At early stage of grain development enzymes of carbohydrate metabolism (glucose/ribitol dehydrogenase, triosephosphate isomerase), antioxidant proteins (peroxiredoxin), defense proteins (serpin) and stress-proteins (HSP70, HSP26 és HSP16,9B) were predominant.

A combined two-dimensional gel electrophoresis – mass spectrometry approach was utilized to characterise cereal proteins, which are important from the human nutrition and food safety points of view. The results also indicated that it is important from the variety selection and food safety points of view to trace the changes in protein composition as a function of environmental factors. The proteome maps of developing and mature cereal will sustain the future studies addressing the effects of genetic and environmental factors on the development and quality of cereal grain.

Using homology based search a proteomic approach was used to identify proteins from organisms, of which little or no genomic information is available. Nanoflow LC-MS/MS after electrophoretic separation was used to study the effect of heat stress on the protein set of *Shewanella hanedai*. On the basis of amino acid sequences obtained by LC-MS/MS a heat shock and a 50S ribosomal protein were identified as the major heat induced proteins in *Shewanella hanedai*.

The recent proteomic investigations open new possibilities to get the best comprehensive knowledge and understanding on the factors affecting food quality.

VII. TÉZISEK

1. A Hereward őszi búza albumin-globulin frakciójából azonosítottam számos metabolikus- (β -amiláz, fruktóz-bifoszfátáz), antioxidáns- (peroxidáz, glioxaláz I), védő- (α -amiláz inhibitorok, tripszin/ α -amiláz inhibitorok) és egyéb fehérjék (ubikvitin, 27K protein) csoportjába sorolható polipeptideket.
2. Meghatároztam a búza albumin-globulin frakciójában levő ismert allergén fehérjék hidrofób-hidrofil tulajdonságait. Megállapítottam, hogy a 0,19, a 0,53 α -amiláz inhibitor és a 27K fehérje hidrofób, míg a szerin proteáz inhibitor, a glioxaláz I, a 0,28 α -amiláz inhibitor és az ubikvitin hidrofil tulajdonsággal jellemezhető, tehát az allergén jelleg nem köthető a hidrofób tulajdonsághoz.
3. A szárazság-stressznek kitett szülői és transzgénikus búza vonalak fehérje-térképében eltérést mutattam ki az alacsonyabb molekulatömegű fehérjék (<28 kDa) tartományában. A különbségfehérjék között azonosítottam egy α -amiláz/tripszin inhibitor CM1 prekursorzt, egy 0,19 dimer α -amiláz inhibitor, egy endogén α -amiláz/szubtilizin inhibitor és egy 27K proteint.
4. Immunreakcióval kimutattam, hogy a szárazság-stressznek kitett transzgénikus búza vonalban különbségfehérjeként szintetizálódott 0,19 dimer α -amiláz inhibitor IgE-kötő epitópot tartalmaz, tehát bizonyítottam az allergén jellegét.
5. 2-DE elválasztás után végzett MS vizsgálattal megállapítottam, hogy a Marko tritikále víz- és só-oldható frakciójában az érés kezdeti szakaszában (virágzás utáni 7. napon) egyes, a szénhidrát metabolizmusban részt vevő enzimek (glükóz/ribitol dehidrogenáz, triózfoszfát izomeráz), bizonyos antioxidáns fehérjék (peroxiredoxin), valamint védő- (szerin proteáz inhibitor) és stresszfehérjék (HSP70, HSP26 és HSP16,9B) expresszáldtak nagyobb mennyiségben.
6. Megállapítottam, hogy a környezeti stressznek kitett Scarlett, Jubilant, Pasadena, Mandolina tavaszi árpa vonalak fehérje-összetétele nem változott meg a kontroll mintákhoz képest.
7. 2-DE elválasztás után LC-MS/MS technikával azonosítottam a kontroll és a hőkezelt *Shewanella hannedei* baktériumban különbségként detektált fehérjéket. Az eddig fel nem térképezett genetikai állományú baktériumban az aminosav-szekvenciák alapján azonosítottam egy hősokk-fehérjét, illetve egy 50S riboszóma fehérjét.

M. 1. Irodalomjegyzék

AEBERSOLD, R.H., PIPES, G., HOOD, L.E., KENT, S.B. (1988): N-terminal and internal sequence determination of microgram amounts of proteins separated by isoelectric focusing in immobilized pH gradients. *Electrophoresis*, 9, 520–530

AALBERSE, R.C. (2000): Structural biology of allergens. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 106, 228-238

AALBERSE, R.C., STAPEL, S.O. (2001): Structure of food allergens in relation to allergenicity. *Pediatric Allergy and Immunology*, 12, 10-14

ANDERSON, L., SEILHAMER, J. (1997): A comparison of selected mRNA and protein abundances in human liver. *Electrophoresis*, 18, 533-537

ANDERSON, N.G., ANDERSON, N.L. (1996): Twenty years of two-dimensional electrophoresis: past, present and future. *Electrophoresis*, 17, 443–453

ANDON, N.L., HOLLINGWORTH, S., KOLLER, A., GEENLAND, A.J., YATES, J.R., HAYNES, P.A. (2002): Proteomic characterization of wheat amyloplasts using identification of proteins by tandem mass spectroscopy. *Proteomics*, 2, 1156–1168

BATTAIS, F., PINEAU, F., POPINEAU, Y., APARICIO, C., KANNY, G., GUERIN, L., MONERET-VAUTRIN, D.A., DENERY-PAPINI, S. (2003): Food allergy to wheat: Identification of immunoglobulin E and immunoglobulin G-binding proteins with sequential extracts and purified proteins from wheat flour. *Clinical and experimental allergy*, 33, 7, 962-970

BEAN, S.R., LOOKHART, G.L. (1997): Separation of wheat proteins by two-dimensional reversed-phase high-performance liquid chromatography plus free zone capillary electrophoresis. *Cereal Chemistry*, 74, 758-765

BEAN, S.R., LOOKHART, G.L. (1998): Faster capillary electrophoresis separation of wheat proteins through modifications to buffer composition and sample handling. *Electrophoresis*, 19, 3190-3198

- BEAN, S.R., LOOKHART, G.L. (1999): Sodium dodecyl sulfate capillary electrophoresis of wheat proteins. 1. Uncoated capillaries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 4246-4255
- BEAN, S.R., LOOKHART G.L. (2000): Electrophoresis of cereal storage proteins. *Journal of Chromatography A*, 881, 23–36
- BEAN, S.R., LOOKHART G.L. (2001): Recent developments in high-performance capillary electrophoresis of cereal proteins. *Electrophoresis*, 22, 1503-1509
- BEYER, K., GRISHINA, G., BARDINA, L., GRISHIN, A., SAMPSON, H.A. (2002): Identification of an 11S globulin as a major hazelnut food allergen in hazelnut-induced systemic reactions. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 110, 517–523
- BIETZ, J.A., SCHMALZRIED, E. (1995): Capillary electrophoresis of wheat gliadin: Initial studies and application to varietal identification. *LWT - Food Science and Technology*, 28, 174-184
- BJELLQVIST, B., EK, K., RIGHETTI, P.G., GIANAZZA, E., GÖRG, A., WESTERMEIER, R., POSTEL, W. (1982): Isoelectric focusing in mobilized pH gradients – principle, methodology and some applications. *Journal of biochemical and biophysical methods*, 6, 317-339
- BLUMENTHAL, C., BEKES, F., GRAS, P.W., BARLOW, E.W.R., WRIGLEY, C.W. (1995): Identification of wheat genotypes tolerant to the effects of heat stress on grain quality. *Cereal Chemistry*, 72, 539–544
- BREITENEDER, H., EBNER, C. (2000): Molecular and biochemical classification of plant-derived food allergens. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 106, 27-36
- CAPELLI, L., FORLANI, F., PERINI, F., GUERRIERI, N., CERLETTI, P., RIGHETTI, P.G. (1998): Wheat cultivar discrimination by capillary electrophoresis of gliadins in isoelectric buffers. *Electrophoresis*, 19, 311-318
- CHAPMAN, J.R. (2000): *Mass Spectrometry of Proteins and Peptides*, Humana Press, Totowa, New Jersey

- CORBELLINI, M., CANEVAR, M.G., MAZZA, L., CIAFFI, M., LAFIANDRA, D., BORGHI, B. (1997): Effect of the duration and intensity of heat shock during grain filling on dry matter and protein accumulation, technological quality and protein composition in bread and durum wheat. *Australian Journal of Plant Physiology*, 24, 245–260
- CORPILLO, D., GARDINI, G., VAIRA, A.M., BASSO, M., AIME, S., ACCOTTO, G.R., FASANO, M. (2004): Proteomics as a tool to improve investigation of substantial equivalence in genetically modified organisms: The case of a virus-resistant tomato. *Proteomics*, 4, 193-200
- DAY, L., GREENWELL, P., LOCK, S., BROWN, H. (1999): Analysis of wheat flour proteins related to grain hardness using capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A*, 836, 147-152
- DOUGHERTY, D.A., WEHLING, R.L., ZEECE, M.G., PARTRIDGE, J.E. (1990): Evaluation of selected baking quality factors of hard red winter-wheat flours by 2-dimensional electrophoresis. *Cereal Chemistry*, 67, 564-569
- DUPONT, F.M., ALTENBACH, S.B. (2003): Molecular and biochemical impacts of environmental factorson wheat grain development and protein synthesis *Journal of Cereal Science*, 38, 133-146
- DUTT, M.J., LEE, K.H. (2000): Proteomic analysis. *Current Opinion in Biotechnology*, 11, 176-179
- ESPARTERO, J., SANCHEZ-AGUAYO, I., PARDO, J.M. (1995): Molecular characterization of glyoxalase-I from a higher plant; upregulation by stress. *Plant Molecular Biology*, 29, 1223-33
- FLAMINI, R., DE ROSSO, M. (2006): Mass spectrometry in the analysis of grape and wine proteins. *Expert review of proteomics*, 3, 321-331
- GEVAERT, K., VANDEKERCKHOVE, J. (2000): Protein identification methods in proteomics. *Electrophoresis*, 21, 1145-1154
- GILBERT, S.M., BURNETT, G.R., MILLS, E.N., BELTON, P.S., SHEWRY, P.R., TATHAM, A.S. (2003): Identification of the wheat seed protein CM3 as a highly active emulsifier using a novel functional screen. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 51, 2019-25

- GOMEZ, L., MARTIN, E., HERNANDEZ, D., SANCHEZ-MONGE, R., BARBER, D., DEL POZO, V., DE ANDRES, B., ARMENTIA, A., LAHOZ, C., SALCEDO, G. (1990): Members of the α -amylase inhibitors family from wheat endosperm are major allergens associated with bakers' asthma. *FEBS Letters*, 261, 85-88
- GYGI, S.P., ROCHON, Y., FRANZA, B.R., AEBERSOLD, R. (1999): Correlation between protein and mRNA abundance in yeast. *Molecular and cellular biology*, 19, 1720-1730
- GODOVAC-ZIMMERMANN, J., BROWN, L.R. (2001): Perspectives for mass spectrometry and functional proteomics. *Mass Spectrometry Reviews*, 20, 1-57
- HAJÓS, GY. (1993): Elektroforézis és alkalmazása az élelmiszerfehérjék elválasztásában. *Élelmiszervizsgálati Közlemények*, 39, 7-25
- HAJÓS, GY., IDEI, M. (2001): Elektroforetikus és elektrokratográfiás módszerek fejlődése és alkalmazási lehetőségei I. *Magyar Kémikusok Lapja*, 56, 364-368
- HALÁSZ, Á., HORVÁTH-SZANICS, E., NAGY-GASZTONYI, M., PAUK, J., HAJÓS, GY. (2007): Traceability of enzyme activities and immune reactivity in albumin-globulin fractions of wide-range herbicide resistant transgenic (bar) wheat lines. *Cereal Research Communication*, in press
- HEAZLEWOOD, J.L., HOWELL, K.A., WHELAN, J., MILLAR, A.H. (2003): Towards an analysis of the rice mitochondrial proteome. *Plant Physiology*, 132, 230-242
- HEJGAARD, J. (2001): Inhibitory serpins from rye grain with glutamine as P1 and P2 residues in the reactive center. *FEBS letters*, 488, 149-153
- HENZEL, W.J., BILLECI, T.M., STULTS, J.T., WONG, S.C., GRIMLEY, C., WATANABE, C. (1993): Identifying proteins from 2-dimensional gels by molecular mass searching of peptide-fragments in protein-sequence databases. *Proceedings of the national academy of sciences of the united states of america*, 90, 5011-5015
- HIRABAYASHI, J., KASAI, K. (2002): Separation technologies for glycomics. *Journal of Chromatography B*, 771, 67-87

HUBER, C.G., PREMSTALLER, A., KLEINDIENST, G. (1999): Evaluation of volatile eluents and electrolytes for high-performance liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry and capillary electrophoresis-electrospray ionization mass spectrometry of proteins - II. Capillary electrophoresis. *Journal of chromatography A*, 849, 175-189

IDEI, M., HAJÓS, GY. (2001): Elektroforetikus és elektrokromatográfiás módszerek fejlődése és alkalmazási lehetőségei II. *Magyar Kémikusok Lapja*, 56, 398-403

ISLAM, N., WOO, S.H., TSUJIMOTO, H., KAWASAKI, H., HIRANO, H. (2002): Proteome approaches to characterize seed storage proteins related to ditelocentric chromosomes in common wheat (*Triticum aestivum* L.). *Proteomics*, 2, 1146–1155

ISLAM, N., TSUJIMOTO, H., HIRANO, H. (2003): Wheat proteomics: relationship between fine chromosome deletion and protein expression. *Proteomics*, 3, 307–316

ISLAM, N., TSUJIMOTO, H., HIRANO, H. (2003): Proteome analysis of diploid, tetraploid and hexaploid wheat: towards understanding genome interaction in protein expression. *Proteomics*, 3, 549–557

JAMES, J.M., SIXBEY, J.P., HELM, R.M., BANNON, G.A., BURKS, A.W. (1997): Wheat α -amylase inhibitor: a second route of allergic sensitization. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 99, 239-244

JONES, R.W., TAYLOR, N.W., SENTI, F.R. (1959): Electrophoresis and fractionation of wheat gluten. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 84, 363-376

JOUBERT, R., STRUB, J.M., ZUGMEYER, S., KOBİ, D., CARTE, N., VAN DORSSELAER, A., BOUCHERIE, H., JAQUET-GUTFREUND, L. (2001): Identification by mass spectrometry of two-dimensional gel electrophoresis-separated proteins extracted from lager brewing yeast. *Electrophoresis*, 22, 2969-2982

KAJI, H., SAITO, H., YAMAUCHI, Y., SHINKAWA, T., TAOKA, M., HIRABAYASHI, J., KASAI, K., TAKAHASHI, N., ISOBE, T. (2003): Lectin affinity capture, isotope-coded tagging and mass spectrometry to identify N-linked glycoproteins. *Nature Biotechnology*, 21, 667–672

- KITTA, K., OHNISHI-KAMEYAMA, M., MORIYAMA, T., OGAWA, T., KAWAMOTO, S. (2006): Detection of low-molecular weight allergens resolved on two-dimensional electrophoresis with acid-urea polyacrylamide gel. *Analytical biochemistry*, 351, 290-297
- KOLLER, A., WASHBURN, M.P., LANGE, B.M., ANDON, N.L., DECIU, C., HAYNES, P.A., HAYS, L., SCHIELTZ, D., ULASZEK, R., WEI, J., WOLTERS, D., YATES, J.R. (2002): Proteomic survey of metabolic pathways in rice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 99, 11969–11974
- KOMATSU, S., YANO, H. (2006): Update and challenges on proteomics in rice. *Proteomics*, 2006, 6, 4057-4068
- LAEMMLI, U.K. (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-685
- LAMETSCH, R., BENDIXEN, E. (2001): Proteome analysis applied to meat science: characterizing post mortem changes in porcine muscle. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 4531–4537
- Lásztity, R. (1981): Gabonafehérjék. Mezőgazdasági Kiadó.
- Lásztity, R. (1999): Cereal Chemistry. Akadémia Kiadó.
- LEHESRANTA, S.J., DAVIES, H.V., SHEPHERD, L.V.T., KOISTINEN, K.M., MASSAT, N., NUNAN, N., MCNICOL, J.W., KARENLAMPI, S.O. (2006): Proteomic analysis of the potato tuber life cycle. *Proteomics*, 6, 6042-6052
- LI, W.Q., HENDRICKSON, C.L., EMMETT, M.R., MARSHALL, A.G. (1999): Identification of intact proteins in mixtures by alternated capillary liquid chromatography electrospray ionization and LC ESI infrared multiphoton dissociation Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry. *Analytical chemistry*, 71, 4397-4402
- LINK, A.J. (1999): 2-D Proteome Analysis Protocols, Humana Press, Totowa, New Jersey

- LOOKHART, G.L., ALBERS, L.D. (1988): Correlations between reversed-phase high-performance liquid-chromatography and acid-polyacrylamide and sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel-electrophoretic data on prolamins from wheat sister lines differing widely in baking quality. *Cereal Chemistry*, 65, 222-227
- LOOKHART, G., BEAN, S. (1995): A fast method for wheat cultivar differentiation using capillary zone electrophoresis. *Cereal Chemistry*, 72, 42-47
- LOOKHART, G., BEAN, S. (1995): Separation and characterization of wheat-protein fractions by high-performance capillary electrophoresis. *Cereal Chemistry*, 72, 527-532
- LOOKHART, G.L., BEAN, S.R., JONES, B.L. (1999): Separation and characterization of barley (*Hordeum vulgare* L.) hordeins by free zone capillary electrophoresis. *Electrophoresis*, 20, 1605-1612
- MAJOUL, T., BANCEL, E., TRIBOI, E., BEN HAMIDA, J., BRANLARD, G. (2003): Proteomic analysis of the effect of heat stress on hexaploid wheat grain: characterization of heat-responsive proteins from total endosperm. *Proteomics*, 3, 175–183
- MAJOUL, T., BANCEL, E., TRIBOI, E., BEN HAMIDA, J., BRANLARD, G. (2004): Proteomic analysis of the effect of heat stress on hexaploid wheat grain: characterization of heat-responsive proteins from non-prolamins fraction. *Proteomics*, 4, 505–513
- MAMONE, G., ADDEO, F., CHIANESE, L., DI LUCCIA, A., DE MARTINO, A., NAPPO, A., FORMISANO, A., DE VIVO, P., FERRANTI, P. (2005): Characterization of wheat gliadin proteins by combined two-dimensional gel electrophoresis and tandem mass spectrometry. *Proteomics*, 5, 2859-2865
- MANN, M., HENDRICKSON, R.C., PANDEY, A. (2001): Analysis of proteins and proteomes by mass spectrometry. *Annual review of biochemistry*, 70, 437-473
- MARRI, C., FRAZZOLI, A., HOCHKOEPLER, A., POGGI, V. (2003): Purification of a polyphenol oxidase isoform from potato (*Solanum tuberosum*) tubers. *Phytochemistry*, 63, 745-752
- MAYER, H.K. (2005): Milk species identification in cheese varieties using electrophoretic, chromatographic and PCR techniques. *International Dairy Journal*, 15, 595-604

- MIERNYK, J.A. (1999): Protein folding in the plant cell. *Plant Physiology*, 121, 695-703
- NARDI, S.; CALCAGNO, C.; ZUNIN, P.; D'EGIDIO, M.G.; CECCHINI, C.; BOGGIA, R.; EVANGELISTI, F. (2003): Nutritional benefits of developing cereals for functional foods. *Cereal Research Communications*, 31, 445-452
- NATALE, M., BISSON, C., MONTI, G., PELTRAN, A., GAROFFO, L.P., VALENTINI, S., FABRIS, C., BERTINO, E., COSCIA, A., CONTI, A. (2004): Cow's milk allergens identification by two-dimensional immunoblotting and mass spectrometry. *Molecular nutrition & Food research*, 48, 363-369
- NEUHOFF, V., STAMM, R., EIBL, H. (1985): Clear background and highly sensitive protein staining with coomassie blue dyes in polyacrylamide gels - a systematic analysis. *Electrophoresis*, 6, 427-448
- NEUHOFF, V., AROLD, N., TAUBE, D., EHRHARDT, W. (1988): Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric-focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250. *Electrophoresis*, 9, 255-262
- O'Farrell, P.H. (1975): High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *The Journal of Biological Chemistry*, 250, 4007-4021
- OLIVIERI, E., VIOTTI, A., LAURIA, M., SIMO-ALFONSO, E., RIGHETTI, P.G. (1999): Variety identification in maize lines via capillary electrophoresis of zeins in isoelectric acidic buffers. *Electrophoresis*, 20, 1595-1604
- ØSTERGAARD, H.; RASMUSSEN, S.K.; ROBERTS, T.H.; HEJGAARD, J. (2000): Inhibitory serpins from wheat grain with reactive centers resembling glutamine-rich repeats of prolamin storage proteins. *The journal of Biological Chemistry*, 275, 33272-33279
- OVANDO, M.E.O., ISOLA, M.C., MALDONADO, A.M., FRANZONI, L. (2004): Purification and properties of iminopeptidase from peanut seeds. *Plant Science*, 66, 1143-1148
- PARRIS, N., DICKEY, L., CRAIG, J. (1997): Quantitative analysis of corn zeins by capillary electrophoresis. *Cereal Chemistry*, 74, 766-770

- PATTON, W.F. (2002): Detection technologies in proteome analysis. *Journal of Chromatography B*, 771, 3-31
- PAYNE, P.I., CORFIELD, K.G., BLACKMAN, J.A. (1979): Identification of a high-molecular-weight subunit of glutenin whose presence correlates with bread-making quality in wheats of related pedigree. *Theoretical and Applied Genetics*, 55,
- PFLIEGER, D., LE CAER, J.P., LEMAIRE, C., BERNARD, B.A., DUJARDIN, G., ROSSIER, J. (2002): Systematic identification of mitochondrial proteins by LC-MS/MS. *Analytical chemistry*, 74, 2400-2406
- PONS, L., CHERY, C., ROMANO, A., NAMOUR, F., ARTESANI, M.C., GUEANT, J.L. (2002): The 18 kDa peanut oleosin is a candidate allergen for IgE-mediated reactions to peanuts. *Allergy*, 57, 88-93
- RABILLOUD, T. (1998): Use of thiourea to increase the solubility of membrane proteins in two-dimensional electrophoresis. *Electrophoresis*, 19, 758–760
- RABILLOUD, T. (2002): Two-dimensional gel electrophoresis in proteomics: Old, old fashioned, but still climbs up the mountains. *Proteomics*, 2, 3-10
- RIGHETTI, P.G., BOSISIO, A.B. (1981): Applications of isoelectric-focusing to the analysis of plant and food proteins. *Electrophoresis*, 2, 65-75
- ROUHIER, N., JACQUOT, J. P. (2005): The plant multigenic family of thiol peroxidases. *Free radical bioogy and medicine*, 38, 1413–1421
- SALEKDEH, G.H., SIOPONGCO, J., WADE, L.J., GHAREYAZIE, B., BENNETT, J. (2002): Proteomic analysis of rice leaves during drought stress and recovery. *Proteomics*, 2, 1131–1145
- SALT, L.J., ROBERTSON, J.A., JENKINS, J.A., MULHOLLAND, F., MILLS, E.N.C. (2005): The identification of foam-forming soluble proteins from wheat (*Triticum aestivum*) dough. *Proteomics*, 5, 1612-1623

- SANDER, I., FLAGGE, A., MERGET, R., HALDER, T.M., MEYER, H.E., BAUR, X. (2001): Identification of wheat flour allergens by means of 2-dimensional immunoblotting. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 107, 907-913
- SANGER, F., COULSON, A.R., HONG, G.F., HILL, D.F., PETERSEN, G.B. (1982): Nucleotide sequence of bacteriophage lambda DNA. *Journal of Molecular Biology*, 162, 729-773
- SCHUBERT, M., PETERSSON, U.A., HAAS, B.J., FUNK, C., SCHRODER, W.P., KIESELBACH, T. (2002): Proteome map of the chloroplast lumen of *Arabidopsis thaliana*. *The Journal of Biological Chemistry*, 277, 8354-8365
- SHAILAJA, K., RATHORE, M., PURI, N., YADAV, D., SINGH, N. K. (2002): PCR amplification of the hypervariable region of wheat triticin genes. *Journal of Cereal Science*, 35, 129-134
- SHEFCHECK, K.J., MUSSER, S.M. (2004): Confirmation of the allergenic peanut protein, Ara h 1, in a model food matrix using liquid chromatography/tandem mass spectrometry (LC/MS/MS). *Journal of agricultural and food chemistry*, 52, 2785-2790
- SHEVCHENKO, A., WILM, M., VORM, O., MANN, M. (1996): Mass spectrometric sequencing of proteins from silver stained polyacrylamide gels. *Analytical Chemistry* 68 (5): 850-858
- SHEWRY, P.R. (1999): The synthesis, processing and deposition of gluten proteins in the developing grain. *Cereal Foods World*, 44, 587-589
- SHEWRY, P.R., BEAUDOIN, F., JENKINS, J., GRIFFITHS-JONES, S., MILLS, E.N.C. (2002): Plant protein families and their relationships to food allergy. *Biochemical Society Transactions*, 30, 906-910
- SHOMER, I., LOOKHART, G.L., SALOMON, R., VASILIVER, R., BEAN, S.R. (1995): Heat coagulation of wheat flour albumins and globulins, their structure and temperature fractionation. *Journal of Cereal Science*, 22, 237-249
- SHOMER, I., LOOKHART, G.L., VASILIVER, R., BEAN, S.R. (1998): Ultrastructure of consecutively extracted and flocculated gliadins and glutenins. *Journal of Cereal Science*, 27, 27-36

SIMO, C., ELVIRA, C., GONZALEZ, N., ROMAN, J.S., BARBAS, C., CIFUENTES, A. (2004): Capillary electrophoresis-mass spectrometry of basic proteins using a new physically adsorbed polymer coating. Some applications in food analysis. *Electrophoresis*, 25, 2056-2064

SKYLAS, D.J., MACKINTOSH, J.A., CORDWELL, S.J., WALSH, B.J., HARRY, J., BLUMENTHAL, C., COPELAND, L., WRIGLEY, C.W., RATHMELL, W.G. (2000): Proteome approach to the characterisation of protein composition in the developing and mature wheat-grain endosperm. *Journal of Cereal Science*, 32, 169–188

SKYLAS, D.J., CORDWELL, S.J., HAINS, P.G., LARSEN, M.R., BASSEAL, D.J., WALSH, B.J., BLUMENTHAL, C., RATHMELL, W., COPELAND, L., WRIGLEY, C.W. (2002): Heat Shock of Wheat During Grain Filling: Proteins Associated with Heat-tolerance. *Journal of Cereal Science*, 35, 175-188

SZIGETI, Z. (2002): Növények és a stressz. In: Növényélettan, A növényi anyagcsere 2. (Ed.: Láng, F.), ELTE Eötvös Kiadó, 1998, 2002

SUMNER, L.W., MENDES, P., DIXON, R.A. (2003): Plant metabolomics: largescale phytochemistry in the functional genomics era. *Phytochemistry*, 62, 817–836

TAFFOREAU, M., VERDUS, M.C., CHARLIONET, R., CABIN-FLAMAN, A., RIPOLL, C. (2002): Two-dimensional electrophoresis investigation of short-term response of flax seedlings to a cold shock. *Electrophoresis*, 23, 2534–2540

TEMPLIN, M.F., STOLL, D., SCHRENK, M., TRAUB, P.C., VOHRINGER, C.F., JOOS, T.O. (2002): Protein microarray technology. *Trends in biotechnology*, 20, 160-166

TSUJI, H., KIMOTO, M., NATORI, Y. (2001): Allergens in major crops. *Nutrition Research*, 21, 925-934

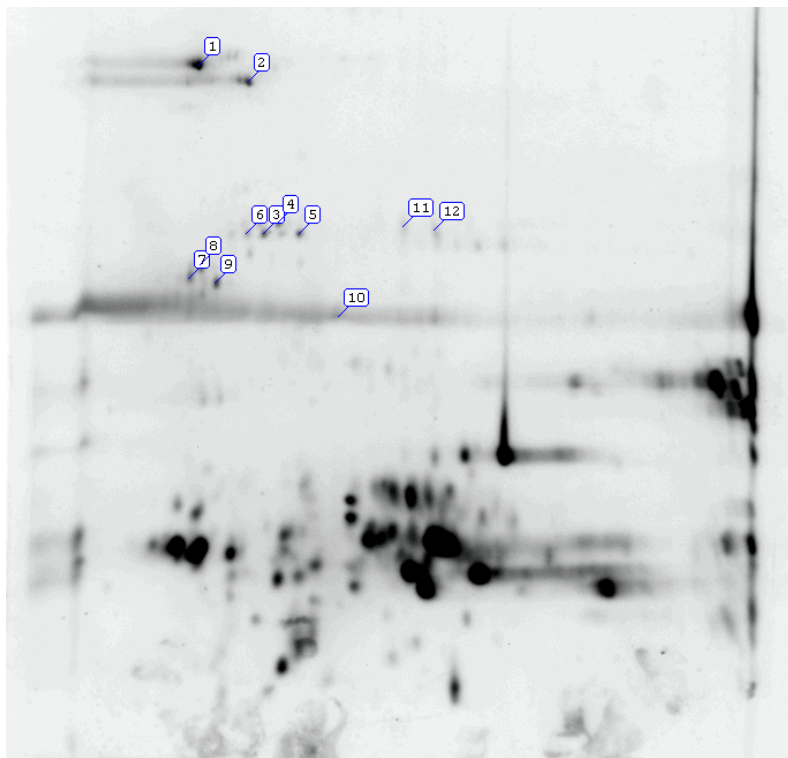
VAIDYANATHAN, S., GOODACRE, R. (2003): Proteome and metabolome analyses for food authentication. In: Food authenticity and traceability (Ed.: Lees, M.), Woodhead Publishing Limited, Cambridge

- VENSEL, W.H., TANAKA, C.K., CAI, N., WONG, J.H., BUCHANAN, B.B., HURKMAN, W.J. (2005): Developmental changes in the metabolic protein profiles of wheat endosperm. *Proteomics*, 5, 1594-1611
- WANG, Y., YANG, L.M., XU, H.B., LI, Q.F., MA, Z.Q., CHU, C.G. (2005): Differential proteomic analysis of proteins in wheat spikes induced by *Fusarium graminearum*. *Proteomics*, 5, 4496-4503
- WASHBURN, M.P., WOLTERS, D., YATES, J.R. (2001): Large-scale analysis of the yeast proteome by multidimensional protein identification technology. *Nature biotechnology*, 19, 242-247
- WEEGELS, P.L., HAMER, R.J., SCHOFIELD, J.D. (1995): RP-HPLC and capillary electrophoresis of subunits from glutenin isolated by SDS and Osborne fractionation. *Journal of cereal science*, 22, 211-224
- WERNER, W.E., WIKTOROWICZ, J.E., KASARDA, D.D. (1994): Wheat varietal identification by capillary electrophoresis of gliadins and high-molecular-weight glutenin subunits. *Cereal Chemistry*, 71, 397-402
- WINSTON, R.L., FITZGERALD, M.C. (1997): Mass spectrometry as a redout of protein structure and function. *Mass Spectrometry Reviews*, 16, 165-179
- WOYCHIK, J.H., BOUNDY, J.A., DIMLER, R.J. (1961): Starch gel electrophoresis of wheat gluten proteins with concentrated urea. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 94, 477-482
- YAHATA, E., MARUYAMA-FUNATSUKI, W., NISHIO, Z., TABIKI, T., TAKATA, K., YAMAMOTO, Y., TANIDA, M., SARUYAMA, H. (2005): Wheat cultivar-specific proteins in grain revealed by 2-DE and their application to cultivar identification of flour. *Proteomics*, 5, 3942-3953
- ZHOU, H., WATTS, J.D., AEBERSOLD, R. (2001): A systematic approach to the analysis of protein phosphorylation. *Nature Biotechnology*, 19, 375-378

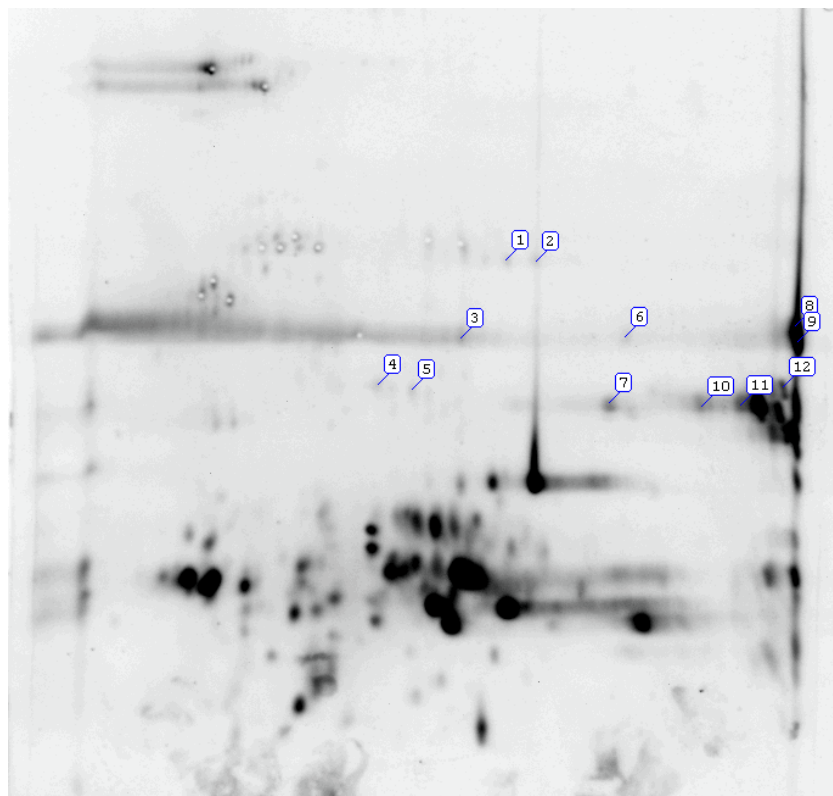
ZHU, H., KLEMIC, J.F., CHANG, S., BERTONE, P., CASAMAYOR, A., KLEMIC, K.G., SMITH, D., GERSTEIN, M., REED, M.A., SNYDER, M. (2000): Analysis of yeast protein kinases using protein chips. *Nature genetics*, 26, 283-289

M. 2. További mellékletek

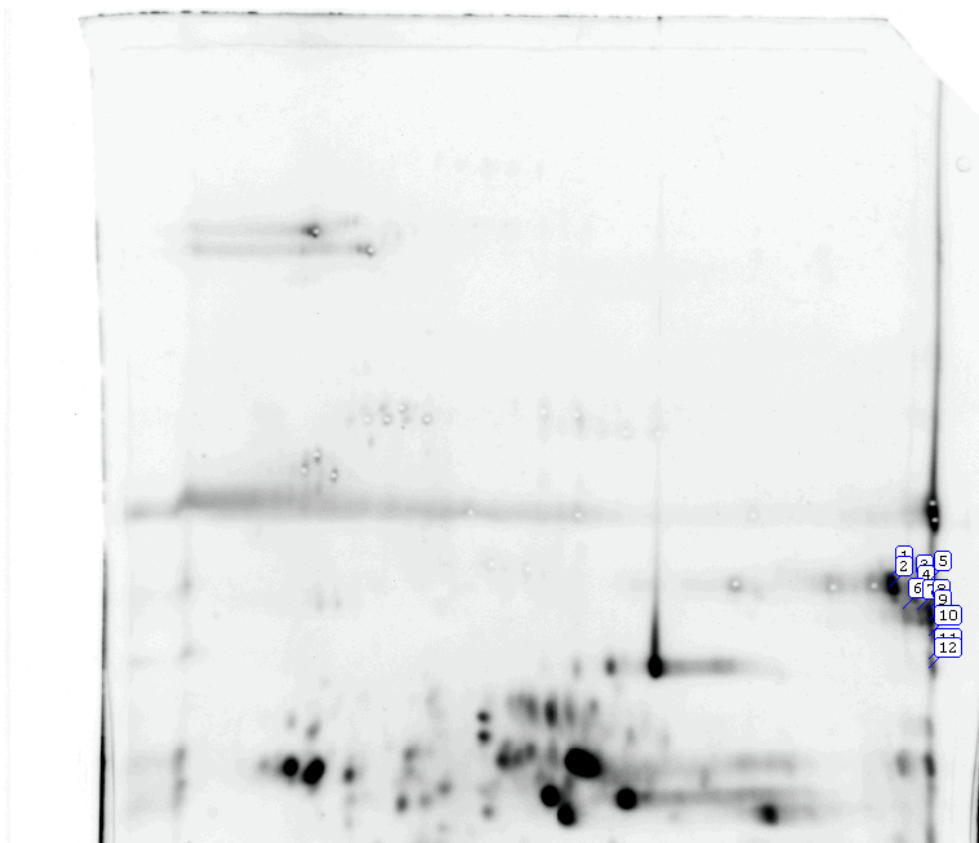
Hereward búza albumin-globulin frakciójából HIC elválasztással nyert hidrofíl alfrakciójából MALDI-TOF MS módszerrel azonosított fehérjék



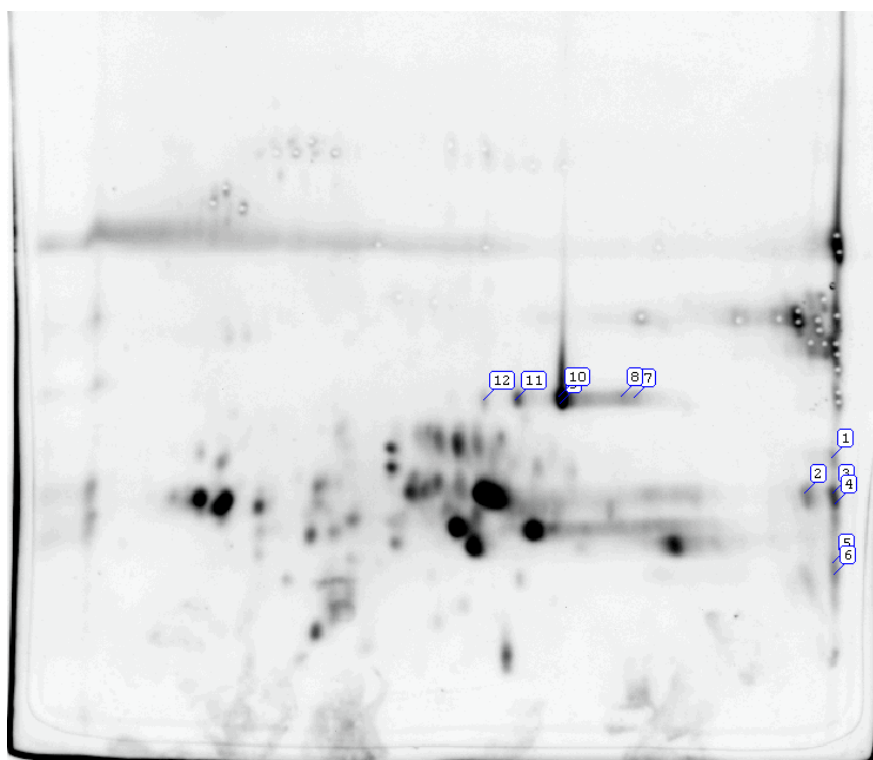
A1-A12



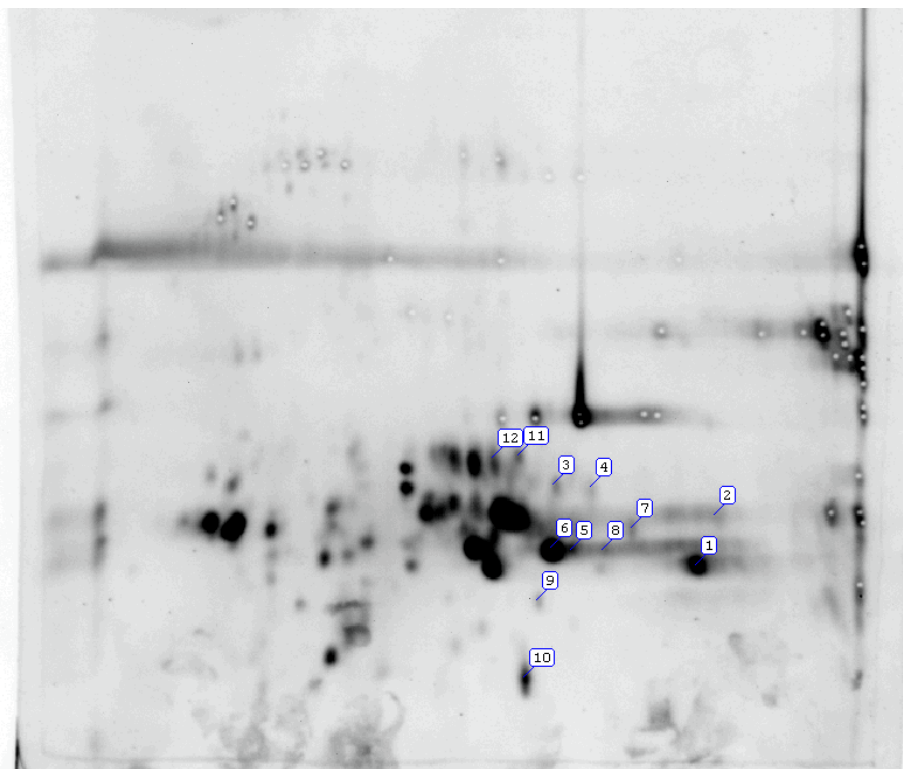
B1-B12



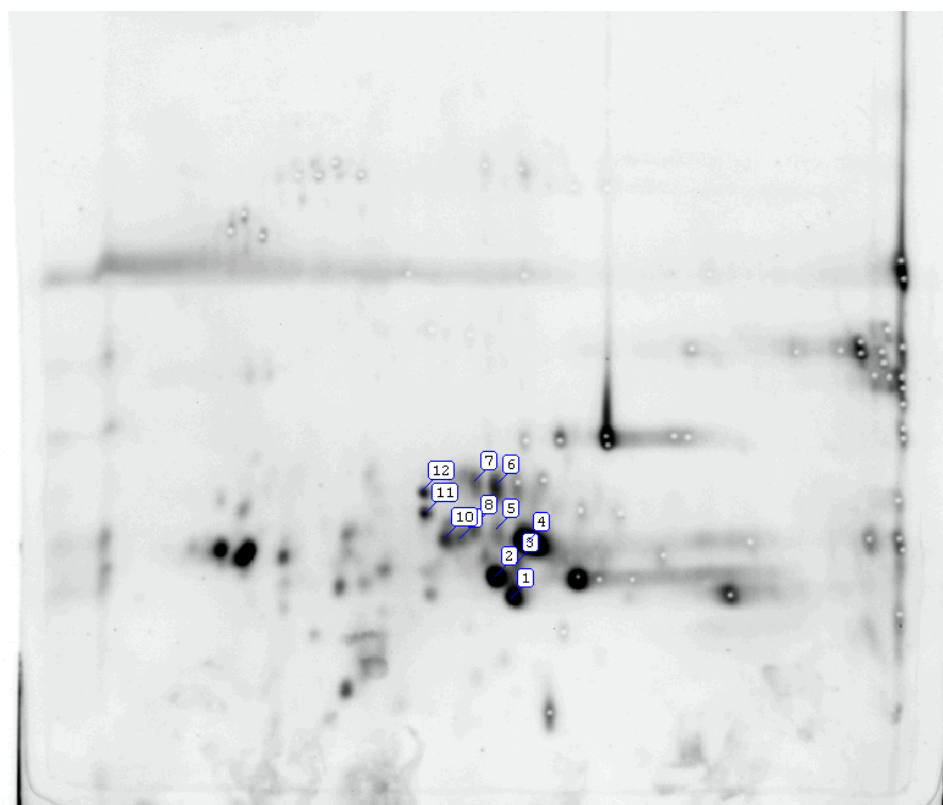
C1-C12



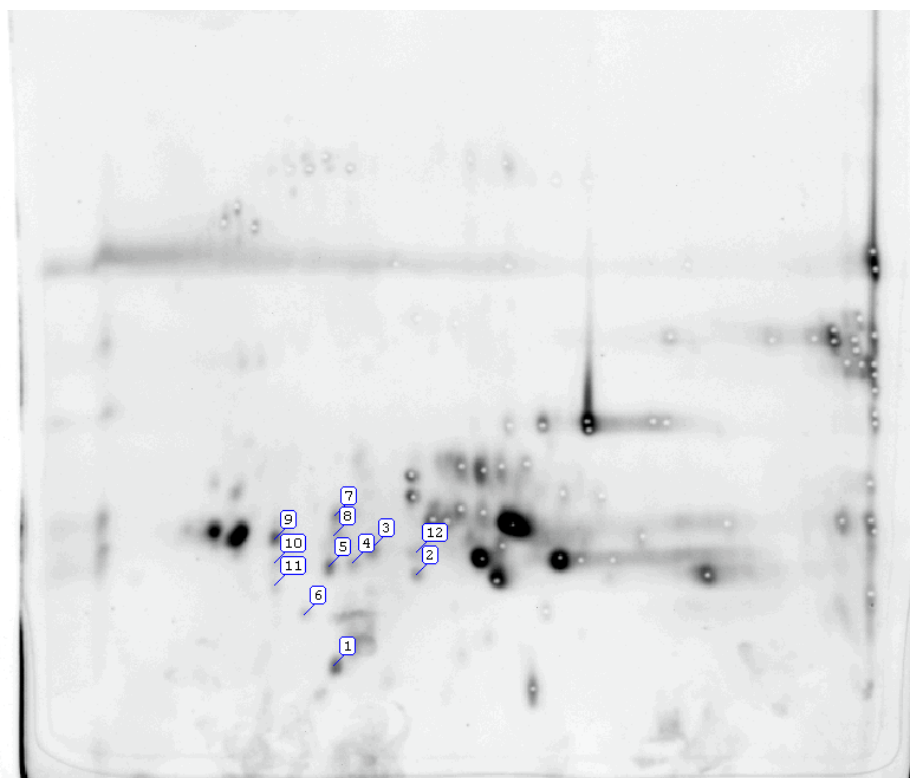
D1-D12



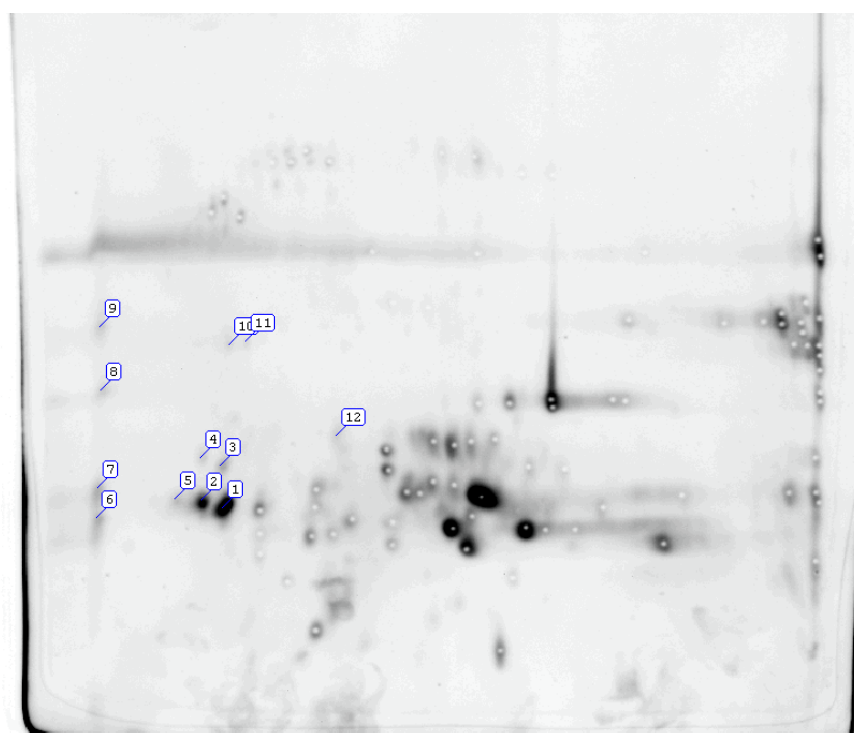
E1-E12



F1-F12



G1-G12



H1-H12

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönetemet fejezem ki **Dr. Bánáti Diánának**, a Központi Élelmiszer-tudományi Kutatóintézet főigazgatónőjének, aki lehetővé tette és támogatta Ph.D. tanulmányaimat.

Külön köszönettel tartozom témavezetőmnek **Dr. Hajós Gyöngyinek** a szakmai és emberi segítségéért.

A gabonaminták biztosítását köszönöm **Dr. Pauk Jánosnak** és **Dr. Bóna Lajosnak** (Gabonatermesztési Kutató Kht., Szeged).

A tömegspektrometriás vizsgálatokat köszönöm **Dr. Janáky Tamásnak** és **Dr. Szabó Zoltánnak** (SZOTE).

Szeretnék köszönetet mondani a KÉKI Táplálkozástudományi Osztályán dolgozó kollégáknak – **Dr. Szabó Erzsébetnek, Dr. Daood Husseinnek, Háderné Sólyom Katalinnak, Némethné Dr. Szerdahelyi Emőkének, Nagyné dr. Gasztonyi Magdolnának, Ondrejó Andrásnének, Dr. Szamos Jenőnek, Sziklai Zsuzsának, Tömösköziné Dr. Farkas Ritának és Záray Lukács Istvánnének** - a baráti légkörért, a szakmai és technikai segítségért.